

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-501654

(P2003-501654A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>		識別記号		F I		テーマコード* (参考)	
G 0 1 N 21/64				G 0 1 N 21/64		A 2 G 0 4 3	
						B 2 G 0 4 5	
						F	
33/483				33/483		C	
33/543		5 9 5		33/543		5 9 5	

(54)【発明の名称】 複数の分析対象物の測定のためのセンサプラットフォーム及び方法

(57)【要約】

本発明は、センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域からの一つ以上のルミネセンスを測定するための、平面薄膜導波路に基づくセンサプラットフォームの変動的な構造に関する。この構造は、第一の光学的に透明な層(a)が、層(a)よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層(b)の上にある光学膜導波路と、励起光を計測区域に結合する又は発光を該計測区域の外に結合するための少なくとも一つの格子構造とを含む。本発明はまた、ルミネセンスを測定するための光学系ならびにセンサプラットフォームと、新規な光学系と、一つ以上のサンプルをセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段とを含む分析系に関する。本発明はまた、ルミネセンスを測定する方法及びそれらの方法の使用に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを測定するためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）と、該層（b）の上の第一の光学的に透明な層（a）とを有し、

励起光を計測区域（d）に内結合するための一つ以上の格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

計測区域中又はいくつかの計測区域を含むセグメント中で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、計測区域又はセグメントに隣接する、ルミネセンス光の外結合のための、格子構造（c）と同じ又は異なる周期の格子構造（c'）によって防止されるセンサプラットフォーム。

【請求項2】 格子構造（c）及び（c'）が、内結合格子及び／又は外結合格子として交換可能に使用され得る、請求項1記載のセンサプラットフォーム。

【請求項3】 格子構造（c）及び（c'）が、横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む横方向に分けられたセグメント（d'）を、好ましくは計測区域の周囲を円形、矩形又は多角形の配置で取り囲む、請求項1～2のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項4】 格子構造（c）及び（c'）の格子線が互いに対して平行である、請求項1～2のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項5】 格子構造（c）及び（c'）が、いくつかの計測区域又はセグメントが位置する共通の連続格子構造を形成する、請求項4記載のセンサプラットフォーム。

【請求項6】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）と、該層（b）の上の第一の光学的に透明な層（a）とを有し、

励起光を計測区域（d）に内結合するための、少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造（c）によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプラットフォーム。

【請求項7】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上のセグメント（d'）からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）と、該層（b）の上の第一の光学的に透明な層（a）とを有し、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域の面積において連続的に変調する格子構造（c）によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプラットフォーム。

【請求項8】 二つ以上の計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造が、異なる波長の励起光の内結合のために異なる周期数の二つ以上の格子構造を重ね合わせたものであり、格子線が互いに対して平行又は非平行、好ましくは非平行に向き、二つの重ね合わせた格子構造の場合、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直である、請求項5又は6記載のセンサプラットフォーム。

【請求項9】 層（a）よりも低い屈折率を有し、層（a）と接触しており、厚さ5 nm～10000 nm、好ましくは10 nm～1000 nmの別の光学的に透明な層（b'）が、光学的に透明な層（a）及び（b）の間に位置している、請求項1～8のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項10】 生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素の固定化の

ために、厚さ200 nm未満、好ましくは20 nm未満の付着促進層（f）が光学的に透明な層（a）上に被着され、付着促進層が、シラン、エポキシド及び「自己組織化官能化単層」からなる群の化合物を含む、請求項1～9のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項11】 横方向に分けられた計測区域（d）が、好ましくは、インクジェットスポッティング、機械的スポッティング、マイクロコンタクトプリント、計測区域と生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素との流体接触からなる方法の群の方法を使用して、平行又は交差マイクロチャネルに供給することにより、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルの印加により、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素をセンサプラットフォームに横方向に選択的に被着させることによって形成される、請求項1～10のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項12】 生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として、核酸（DNA、RNA、...）及び核酸類似体（PNA...）、抗体、アプタマー、膜結合し、単離された受容体、それらの配位子、抗体に対する抗原、「ヒスチジナグ成分」、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成された空洞などが被着されるか、あるいは、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として、全細胞又は細胞断片が被着される、請求項11記載のセンサプラットフォーム。

【請求項13】 非特異的結合又は吸着を最小限にするため、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物、好ましくは、たとえばウシ血清アルブミン又はポリエチレングリコールからなる群の化合物が横方向に分けられた計測区域（d）の間に被着される、請求項11～12のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項14】 二つ以上の横方向に分けられた計測区域が一般にセンサプラットフォーム上でセグメントに組み合わせられ、異なるセグメントが、好ましくはさらに、隣接区域の間の流体シール及び／又は隣接セグメント間の光学クロストークのさらなる軽減に貢献する被着された境界によって互いに分けられる、請求項1～13のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項15】 100,000個までの計測区域が二次元配置で設けられ、一つの計測区域が $0.001\text{ nm}^2 \sim 6\text{ nm}^2$ の面積を有する、請求項1～14のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項16】 格子構造(c)が、均一な周期の回折格子又は多重回折格子である、請求項1～15のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項17】 格子構造(c)が、内結合された光の層(a)中での伝播方向に対して平行又は垂直に、横方向に変化する周期数を有する、請求項1～15のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項18】 第二の光学的に透明な層(b)の材料が、石英、ガラス又は、たとえばポリカーボネート、ポリイミドもしくはポリメチルメタクリレートからなる群の透明な熱可塑性プラスチックを含む、請求項1～17のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項19】 第一の光学的に透明な層(a)の屈折率が2よりも大きい、請求項1～18のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項20】 第一の光学的に透明な層(a)が、 $\text{TiO}_2$ 、 $\text{ZnO}$ 、 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 、 $\text{Ta}_2\text{O}_5$ 、 $\text{HfO}_2$ 又は $\text{ZrO}_2$ 、特に好ましくは $\text{TiO}_2$ 又は $\text{Ta}_2\text{O}_5$ を含む、請求項1～18のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項21】 第一の光学的に透明な層(a)の厚さが $40 \sim 300\text{ nm}$ 、好ましくは $70 \sim 160\text{ nm}$ である、請求項1～20のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項22】 格子(c)が、 $200\text{ nm} \sim 1000\text{ nm}$ の周期及び $3\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ 、好ましくは $10\text{ nm} \sim 30\text{ nm}$ の変調深さを有する、請求項1～21のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項23】 励起光及び／又は逆結合されたルミネセンス光の不完全な内結合及び外結合により、一つの計測区域内又はいくつかの計測区域を横切る、誘導された励起光及び／又は発生したルミネセンス光の強さの、格子深さによって制御することができるプラス勾配が、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に生成される、請求項5若しくは6又は請求項9～21のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項24】 格子(c)が、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に、横方向に異なる格子深さを有する、請求項23記載のセンサプラットフォーム。

【請求項25】 一つの計測区域内又はいくつかの計測区域を横切る、誘導された励起光及び／又は発生したルミネセンス光の強さの、光学的に透明な層(a)中での伝播損失の程度によって制御することができるマイナス勾配が、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に生成される、請求項1～22のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項26】 第一の光学的に透明な層(a)の厚さに対する変調深さの比が0.2以下である、請求項22記載のセンサプラットフォーム。

【請求項27】 格子構造(c)が、矩形、三角形又は半円形のプロフィールをもつレリーフ格子又は本質的に平面的な光学的に透明な層(a)において周期変調を有する位相もしくは体積格子である、請求項1～26のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項28】 光学系における調節を簡単にするため及び／又はサンプル区画を分析系の一部として接続するための、光学的又は機械的に認識可能なマークが上に設けられている、請求項1～27のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項29】 少なくとも一つの励起光源と、  
請求項1～28のいずれか1項記載のセンサプラットフォームと、  
センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域(d)から発する光を収集するための少なくとも一つの検出器と  
を含む、一つ以上のルミネセンスを測定するための光学系。

【請求項30】 励起光が直接又は透過照射の配置で計測区域に投射される、請求項29記載の光学系。

【請求項31】 ルミネセンス光の検出が、格子構造(c)又は(c')によって外結合されるルミネセンス光が同じく検出器によって収集されるような方法で実施される、請求項29～30のいずれか1項記載の光学系。

【請求項32】 少なくとも一つの光源から発される励起光がコヒーレント

であり、光学的に透明な層（a）への結合のための共振角で一つ以上の計測区域に投射される、請求項29記載の光学系。

【請求項33】 少なくとも一つの光源からの励起光が光線拡大光学部品によって本質的に平行な光線ビームに拡大され、一つ以上の計測区域に投射され、投射が、好ましくは、光学的に透明な層（a）に結合するための共振角で実施される、請求項32記載の光学系。

【請求項34】 少なくとも一つの光源からの励起光が、回折光学要素又は、光源が多数ある場合には、好ましくはDammann格子である多数の回折光学要素又は好ましくはマイクロレンズアレイである屈折光学要素によって可能な限り均一な強さの複数の個々の光線に多重化され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、横方向に分けられた計測区域に投射される、請求項29～33のいずれか1項記載の光学系。

【請求項35】 同様な又は異なる発光波長の二つ以上のコヒーレント光源が励起光源として使用される、請求項29～33のいずれか1項記載の光学系。

【請求項36】 二つ以上のコヒーレント光源からの励起光が異なる方向から同時又は順次に、異なる周期数の格子構造を重ね合わせたものを含む格子構造（c）に投射される、請求項8記載のセンサプラットフォームを含む請求項35記載の光学系。

【請求項37】 たとえばCCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャネルプレート及びマルチチャネル光電子増倍管からなる群の横方向分割検出器が信号検出に使用される、請求項29～36のいずれか1項記載の光学系。

【請求項38】 伝送された光束を成形するためのレンズもしくはレンズ系、光束を偏向させ、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲ミラー、光束を偏向させ、場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の一部分をスペクトル選択的に偏向させるための二色性ミラー、伝送される光の強さを調整するためのニュートラル濃度フィルタ、光束の一部分をスペクトル選択的に伝送するための光学フィルタもしくはモノクロメータ、又は励起もしくはルミネセンス光の別々の偏光方向を選択するための偏光選択要素からなる群の光



学部品が、一つ以上の励起光源と請求項1～28のいずれか1項記載のセンサプラットフォームとの間及び／又は該センサプラットフォームと一つ以上の検出器との間に位置する、請求項29～37のいずれか1項記載の光学系。

【請求項39】 励起光が1 fsec～10 minの間隔のパルスで投射され、計測区域からの発光が時間分解的に計測される、請求項29～38のいずれか1項記載の光学系。

【請求項40】 計測区域の他にも、参照のために、光源の位置での励起光又は拡大後の励起光又は個々のビームへの多重化後の励起光、一つ以上の横方向に分けられた計測区域の位置からの励起波長の散乱光及び格子構造(c)によって外結合された励起波長の光からなる群の光信号が計測される、請求項29～39のいずれか1項記載の光学系。

【請求項41】 発光の測定のための計測区域と参照信号の測定のための計測区域とが同一である、請求項40記載の光学系。

【請求項42】 励起光の投射及び一つ以上の計測区域からの発光の検出が一つ以上の計測区域で順次に実施される、請求項29～41のいずれか1項記載の光学系。

【請求項43】 順次の励起及び検出が、ミラー、偏向プリズム及び二色性ミラーからなる群の可動光学部品を使用して実施される、請求項42記載の光学系。

【請求項44】 順次の励起及び検出が、本質的に焦点及び角度を保存するスキャナを使用して実施される、請求項42記載の光学系。

【請求項45】 センサプラットフォームが、順次の励起及び検出の過程の間で動かされる、請求項42～44のいずれか1項記載の光学系。

【請求項46】 センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域上の少なくとも一つのサンプル中の一つ以上の分析対象物をルミネセンス検出によって測定するための、光学膜導波路を含む分析系であって、

請求項1～28のいずれか1項記載のセンサプラットフォームと、

請求項29～45のいずれか1項記載の光学系と、

一つ以上のサンプルをセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるため

の供給手段と  
を含む分析系。

【請求項47】 該分析系が、一つ以上の計測区域又はセグメントに組み合わされた計測区域内に少なくとも存在し、センサプラットフォームに向けて開口した一つ以上のサンプル区画をさらに含み、サンプル区画が好ましくは $0.1\text{ nl} \sim 100\text{ }\mu\text{ l}$ の容積を有する、請求項46記載の分析系。

【請求項48】 サンプル区画が、光学的に透明な層（a）とは反対側にある、サンプルの供給又は吐き出しのための入口及び／又は出口開口を除き、閉じており、サンプル及び場合によってはさらなる試薬の供給又は吐き出しが系を通して閉鎖流で実施され、共通の入口及び出口開口を有するいくつかの計測区域又はセグメントへの液体供給の場合、これらの開口が好ましくは行ごと又は列ごとに指定される、請求項47記載の分析系。

【請求項49】 サンプル区画が、光学的に透明な層（a）とは反対側に、サンプル又は他の試薬の場所指定供給又は取り出しのための開口を有する、請求項47記載の分析系。

【請求項50】 一つ以上の分析対象物の測定のための検定の間に湿潤され、計測区域と接触させられる試薬のための区画が設けられている、請求項47～49のいずれか1項記載の分析系。

【請求項51】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを測定するための、センサプラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域上の一つ以上のサンプル中の一つ以上の分析対象物のルミネセンス検出による測定方法であって、

第一の光学的に透明な層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）と、該層（b）の上の第一の光学的に透明な層（a）とを有し、

励起光を計測区域（d）に内結合するための一つ以上の格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測

区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

計測区域又はいくつかの計測区域を含むセグメントで発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークを、計測区域又はセグメントに隣接する、ルミネセンス光の外結合のための、格子構造（c）と同じ又は異なる周期の格子構造（c'）によって防ぐ方法。

【請求項52】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを同時に測定するための、センサプラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域上の一つ以上のサンプル中の一つ以上の分析対象物のルミネセンス検出による同時測定の方法であって、

第一の光学的に透明な層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）と、該層（b）の上の第一の光学的に透明な層（a）とを有し、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークを、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造（c）によってこのルミネセンス光を外結合することによって防ぐ方法。

【請求項53】 計測区域の励起光を格子構造（c）によって光学的に透明な層（a）に結合する、請求項52記載の方法。

【請求項54】 （1）等方向に発されたルミネセンス若しくは（2）光学的に透明な層（a）に逆結合され、格子構造（c）によって外結合されるルミネセンス又は両方の部分（1）及び（2）のルミネセンスを同時に計測する、請求項51～53のいずれか1項記載の一つ以上のルミネセンスを測定する方法。

【請求項55】 一つの計測区域内及び／又はいくつかの計測区域にかけて、内結合される励起光の伝播方向に対して平行な誘導される励起光及び／又は励起ルミネセンス光の制御可能な勾配によって信号計測及び／又は分析対象物定量のダイナミックレンジを増大又は制限する、請求項23～25のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム上のルミネセンス検出によって一つ以上の分析対象物を測定する方法。

【請求項56】 ルミネセンスの発生のために、励起することができ、300 nm～1100 nmの波長で発光するルミネセンス標識として発光染料又はナノ粒子を使用する、請求項41～55のいずれか1項記載の方法。

【請求項57】 ルミネセンス標識を、分析対象物又は、競合検定では、分析対象物類似体又は、多ステップ検定では、固定化された生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素の結合相手の一つ又は生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素に結合させる、請求項56記載の方法。

【請求項58】 第一のルミネセンス標識と同様又は異なる励起波長及び同様又は異なる発光波長の第二又はそれ以上のルミネセンス標識を使用する、請求項56～57のいずれか1項記載の方法。

【請求項59】 第二又はそれ以上のルミネセンス標識が、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起でき、他の波長で発光する、請求項58記載の方法。

【請求項60】 加えられる発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルと

が重複しないか、部分的にしか重複しない、請求項58記載の方法。

【請求項61】 供与体として働く第一の発光染料から受容体として働く第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動を分析対象物の検出に使用する、請求項58記載の方法。

【請求項62】 一つ以上のルミネセンスの測定の外に、計測区域における有効屈折率の変化を測定する、請求項51～61のいずれか1項記載の方法。

【請求項63】 一つ以上のルミネセンス及び／又は励起波長での光信号の測定を偏光選択的に実施し、好ましくは、励起光の偏光とは異なる偏光で一つ以上のルミネセンスを計測する、請求項51～62のいずれか1項記載の方法。

【請求項64】 抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジンタグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNAもしくはRNAストランド、DNAもしくはRNA類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害剤、レクチン及び炭水化物からなる群の一つ以上の分析対象物を同時又は順次に定量的又は定性的に測定するための、請求項51～63のいずれか1項記載の方法。

【請求項65】 試験するサンプルが、天然の体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄又は光学的に濁った液体又は表面水又は土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであるか、生物学的組織から採取される、請求項51～64のいずれか1項記載の方法。

【請求項66】 薬学研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発における化学的、生化学的又は生物学的分析対象物のスクリーニング法での測定、親和性スクリーニング及び研究におけるリアルタイム結合研究及び運動パラメータの測定、定性的及び定量的な分析対象物測定、特にDNA及びRNA分析、医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における毒性発生研究及び発現プロファイルの決定及び抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、医薬品開発、患者の層別化、治療薬の選択、食品及び環境分析における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの測定のための、請求項51～65のいずれか1項記載の方法の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域からの一つ以上のルミネセンスを測定するための、第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にある状態の、異なる層からなる光学膜導波路（「層化導波路」）と、励起光を計測区域に内結合（インカップル）するための少なくとも一つの格子構造とを含む、平面薄膜導波路に基づくセンサプラットフォームの可変的な実施態様に関する。本発明はまた、励起光源と、本発明のセンサプラットフォームの実施態様と、センサプラットフォーム上の計測区域から出る光を収集するための少なくとも一つの検出器とを含む、ルミネセンス測定のための光学系ならびに本発明のセンサプラットフォームと、本発明の光学系と、一つ以上のサンプルをセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段とを含む分析系に関する。本発明のさらなる主題は、本発明のセンサプラットフォーム、光学系及び分析系に基づくルミネセンス検出による測定方法ならびに定量的親和性感知及びさらなる異なる用途のためのこれらの方法の使用である。

## 【0002】

本発明の目的は、センサプラットフォームならびに一つ以上の分析対象物の高感度測定のための光学及び分析計測構造を提供することである。

## 【0003】

光波が、より低い屈折率の媒体によって取り囲まれた平面薄膜導波路に結合されると、その光波は、導波層の界面における全反射によって誘導される。最も簡単な場合、平面薄膜導波路は、三層系、すなわち支持材（基材）、導波層、サブストレート（及び分析されるサンプル）からなり、導波層が最も高い屈折率を有する。さらなる中間層が、平面導波路の動作をさらに改善することができる。

## 【0004】

この構造では、電磁エネルギーの一部がより低い屈折率の媒体に浸透する。この部分が減衰フィールドと呼ばれる。減衰フィールド（エバネッセント）の強さは、導波層そのものの厚さ及び導波層の屈折率とそれを取り囲む媒体の屈折率と

の比に非常に大きく依存する。薄い導波路、すなわち、誘導される光の波長と同じ又はそれよりも小さい層厚さの場合、誘導される光の離散的なモードを区別することができる。

#### 【0005】

励起光を平面導波路に内結合する方法はいくつか公知である。最も初期に使用された方法は、エアギャップによる反射を減らすため、一般には液体がプリズムと導波路との間に導入される、前面結合又はプリズム結合に基づくものであった。これら二つの方法は、主に、比較的大きな層厚さの導波路、すなわち、特に自立的導波路及び2よりも有意に小さい屈折率の導波路に関して適している。しかし、励起光を高い屈折率の非常に薄い導波層に内結合するためには、結合格子の使用がはるかに洗練された方法である。

#### 【0006】

光学膜（層化）導波路中を誘導される光波の減衰フィールドにおける分析対象物測定の種類の方法は、区別することができる。たとえば、適用される計測原理に基づく、一つには蛍光、すなわちより一般的なルミネセンス法と、他には屈折法とに区別することができる。これに関して、表面プラズモン共振の発生のために投射される励起光の共振角が計測される量として取られるならば、より低い屈折率の誘電層の上の薄い金属層中に表面プラズモン共振を発生させる方法を屈折法の群に含めることができる。表面プラズモン共振はまた、ルミネセンス計測において、ルミネセンスの増幅又は信号バックグラウンド比の改善に使用することもできる。表面プラズモン共振の発生ならびにルミネセンス計測及び導波構造との組み合わせの条件は、文献、たとえば米国特許US5,478,755、US5,841,143、US5,006,716及びUS4,649,280に記載されている。

#### 【0007】

本明細書では、「ルミネセンス」とは、光学的又は光学的以外の励起（たとえば電氣的又は化学的又は生化学的又は熱的励起）ののちに起こる、紫外線から赤外線までの範囲における光子の自発的放出をいう。

#### 【0008】

たとえば、ケミルミネセンス、バイオルミネセンス、エレクトロルミネセンス、特に蛍光及びりん光が「ルミネセンス」に含まれる。

#### 【0009】

屈折計測法の場合、導波路への分子吸着又は導波路からの分子脱着から生じる有効屈折率の変化を分析対象物検出に使用する。この有効屈折率の変化は、格子カプラセンサの場合、光の、格子カプラセンサへの内結合又は格子カプラセンサからの外結合（アウトカップル）のための結合角の変化から測定され、干渉計センサの場合、感知ブランチ中で誘導される計測光と干渉計の参照ブランチとの位相差の変化から測定される。

#### 【0010】

誘導される光波を内結合及び／又は外結合する（一つ以上の結合格子によって）ために一つ以上の結合格子を使用する現在の技術水準が、たとえば、K. Tiefenthaler、W. Lukoszの「Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors」、J. Opt. Soc. Am. B6, 209 (1989)、W. Lukosz、Ph. M. Nellen、Ch. Stamm、P. Weissの「Output Grating Couplers on Planar Waveguides as Integrated, Optical Chemical Sensors」、Sensors and Actuators B1, 585 (1990)及びT. Tamir、S. T. Pengの「Analysis and Design of Grating Couplers」、Appl. Phys. 14, 235-254 (1977)に記載されている。

#### 【0011】

前記屈折法は、さらなるマーカ分子、いわゆる分子標識を使用せずに適用することができるという利点がある。しかし、これらの標識なし法の欠点は、より低い計測原理の選択性のせいで、達成可能な検出限界が、分析対象物の分子量に依存してピコ～ナノモル濃度範囲に限られ、それが、現代の微量分析の多くの用途、たとえば診断用途には十分ではないことである。

#### 【0012】

より低い検出限界を達成するためには、より高い信号生成の選択性のため、ルミネセンスベースの方法がより適当であると思われる。この構造では、ルミネセンス励起は、より低い屈折率の媒体への減衰フィールドの浸透深さ、すなわち、



媒体への浸透深さが何百ナノメートル程度であるとき、導波区域に近接する区域に限られる。この原理は減衰ルミネセンス励起と呼ばれている。

#### 【0013】

分析論として、励起が導波層のすぐ近隣に限定され、バルク媒体の深さからの混乱効果を最小限にすることができるため、減衰ルミネセンス励起が非常に重要である。

#### 【0014】

減衰励起の条件下で平面光学導波路を使用してバイオセンサのルミネセンスを測定するための光度計器が同様に公知であり、たとえばWO90/06503に記載されている。同明細書で使用されている導波層は厚さ160nm～1000nmであり、励起波は格子カップラなしで結合される。

#### 【0015】

減衰的に励起されるルミネセンスの感度を高め、集積光センサを製造する種々の試みが成されている。たとえば、Biosensors & Bioelectronics 6 (1991), 595-607の報告書が、プリズムを使用して励起波を内結合する、2工程イオン交換法で製造される平面単一モード又は低モード導波路を記載している。使用される親和性系は、ヒト免疫グロブリンG／フルオレセイン標識タンパク質Aであり、抗体が導波路上に固定化され、検出されるフルオレセイン標識タンパク質Aがリン酸緩衝液中でポリビニルアルコール膜に加えられ、この膜で導波路の計測領域が覆われる。

#### 【0016】

この方法の大きな欠点は、導波層と基材層との間で小さな屈折率差しか達成することができず、その結果、感度が比較的低いということである。

#### 【0017】

感度は、フルオレセイン標識タンパク質Aの20nMとして得られる。これは、非常に小さな痕跡の測定にはまだ不十分であり、したがって、感度のさらなる増大が求められる。加えて、プリズムを使用する光の内結合は再現しにくく、内結合効率がプリズムと導波路との接触面の質及びサイズに大きく依存するため、実施しにくい。

## 【0018】

米国特許第5,081,012号では、異なる原理が発案されている。平面導波層は、厚さ200nm~1000nmであり、二つ格子を含み、そのうち一方が反射格子の形態であり、その結果、内結合された光波は、格子と格子との間でセンサ領域を少なくとも二回通過しなければならない。これは、感度を増大させると考えられる。欠点は、反射した放射線がバックグラウンド放射線強さの望ましくない増大を招くかもしれないことである。

## 【0019】

WO91/10122は、内結合格子と、物理的に離れた外結合格子とを含む薄層分光センサを記載している。高屈折率の無機金属酸化物を導波層として使用するならば、これは、吸収計測に特に適している。マルチクロマチック光源の内結合及び外結合に適した種々の実施態様が記載されている。導波層の好ましい厚さは200nmを超え、格子深さは約100nmであるべきである。これらの条件は、低い感度しか得られないため、親和性感知におけるルミネセンス計測には適さない。これは、Appl. Optics Vol. 29, No. 31 (1990), 4583-4589で、これらの系の全体効率のデータ（633nmで0.3%及び514nmで0.01%）によって確認されている。

## 【0020】

同じセンサのもう一つの実施態様では、ガス混合物分析装置として使用することができ、複数のポリマー平面導波路層が基材に被着される。この場合、たとえば溶媒蒸気と接触したときのポリマー導波路の有効屈折率の変化又は層厚さの変化を利用する。そのため、導波構造は物理的に変更されている。しかし、このような変化は、内結合が変化して散乱の発生を増し、感度の有意な低下が起こりうるため、親和性感知におけるルミネセンス計測には全く不適當である。

## 【0021】

ルミネセンス増幅が、導波路の表面又はその近く（すなわち、何百ナノメートルまでの距離で）で発光分子が励起したとき、励起光の直接的な内結合なしで、ただし、近接場効果によって媒介されて起こると考えられる他の構造が公知である。たとえば、米国特許第4,649,280号には、基材上の導電性かつ反射性

の材料（たとえば銀）と、誘電性光学導波路（たとえば屈折率わずか1.39のフッ化リチウム）と、その上に被着された、蛍光を発することができる分子の膜との多層系が記載されている。さらなる発展で、米国特許第5,006,716号では、導電膜を表面レリーフ格子の形態に製造することがさらに提案されている。この形態は、最終構造の製造の付着処理の過程で表面に達するまで再現される。この構造の利点として、導波層に結合されたルミネセンス光を、格子により、外結合された回折オーダ及び導波路中で誘導されるモードに対応する離散的な空間方向に外結合することができ、それにより、検出器を外結合されたルミネセンス光の方向に配置したならば、より大きなルミネセンスの部分を検出器によって収集することが可能になることが記載されている。しかし、比較的低い屈折率の導波層をもつこれらの構造の不可欠な部分は、その下に位置する反射金属層の存在である。

#### 【0022】

しかし、再現可能な製造の場合、薄膜導波路のような、より簡単な二層系がより適当であると思われる。また、減衰フィールドの強さを増すために、できるだけ高い屈折率の導波膜を使用することが非常に望ましい。

#### 【0023】

近年、透明な支持材料上のわずか何百ナノメートルの薄い導波膜に基づく屈折率の高い薄膜導波路により、感度を大幅に高めることができた。たとえばWO95/33197には、回折光学要素としてのレリーフ格子によって励起光を導波膜に結合する方法が記載されている。センサプラットフォームの表面を、分析対象物を含有するサンプルと接触させ、減衰フィールドの浸透深さ内に位置する、発光することができる物質から等方的に発されるルミネセンスを適切な計測構造、たとえばフォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラによって計測する。また、減衰的に励起された放射線のうち、導波路に逆結合した部分を、光子のような回折光学要素によって外結合し、計測することができる。この方法は、たとえば、WO95/33198に記載されている。

#### 【0024】

現在の技術水準として特に明細書WO95/33197及びWO95/331

98に記載されている、減衰的に励起されるルミネセンスを検出する方法すべての欠点は、センサプラットフォームの、均質な膜として形成された導波層上で常に一つのサンプルしか分析することができないことである。同じセンサプラットフォーム上でさらなる計測を実施するためには、退屈な洗浄又は清浄工程が絶えず求められる。これは、最初の計測の分析対象物とは異なる分析対象物を測定しなければならない場合、特に当てはまる。免疫検定の場合、これは一般に、センサプラットフォームの固定化層をまるごと交換しなければならないか、全く新たなセンサプラットフォームを使用しなければならないことを意味する。

#### 【0025】

したがって、多数のサンプルを並列に、すなわち同時に又はさらなる清浄工程なしで続けざまに分析することを可能にする方法を開発する必要性がある。

#### 【0026】

たとえば、WO95/03538では、連続導波層上に、導波層の上のベースプレートの凹みとして形成された多数のサンプルセルを設けることが提案されている。各サンプルセルの下には、導波層中で誘導される光の一部を外結合する格子が位置している。分析対象物の測定は、分析対象物濃度の関数としての外結合角の変化に基づく。一般に、屈折率の変化に基づくこの方法は、ルミネセンス法よりも大幅に感度が低い。

#### 【0027】

WO94/27137は、たとえば、減衰的に励起される蛍光を使用して免疫検定を実施するための装置及び方法を発案している。装置は、2枚の面平行面と、レンズとともに内結合要素として働く側方縁とを有する連続光学導波路からなる。複数の特異的結合相手が少なくとも一つの面上に固定化されている。好ましい実施態様では、これらの特異的結合相手は、連続導波路上に、互いに物理的に離間するようにアレイされている。実施例では、導波路の表面上にドットの形態で分散している。

#### 【0028】

開示された実施態様に基づく、側方縁を介して内結合することによって達成される効率は、格子を介して内結合する場合の効率よりも低いと推定されなけれ

ばならない。さらには、大きな層厚さ（自立型導波路）のせいで、減衰フィールドの強さ、ひいては励起効率は、比較的小さな層厚さの単モード導波路の場合よりも大幅に低い。結果として、総じて構造の感度が制限される。

#### 【0029】

種々の特異的結合相手が連続導波層に被着されるこれらの構造はまた、励起光がフルオロフォア標識分子すべてを励起するという欠点を抱えている。したがって、場所に応じた計測場所の選択は可能ではない。加えて、減衰的に逆結合された蛍光光子は、隣接ドットからの信号に影響し、ひいては計測誤差を招くおそれがある。

#### 【0030】

遠隔通信に応用するための集積光学系では、チャンネルの形態の導波路を含む平面光学部品が公知である。導波チャンネルは、マスクを援用する表面での個々のイオンの交換によって製造される (Glastechnische Berichte Vol. 62, page 285, 1989)。イオンでドーピングされたチャンネルの中で屈折率のわずかな増加を示す物理的に相互接続された層が得られる。増加は一般に5%未満である。そのような部品は複雑であり、製造に費用がかかる。

#### 【0031】

SPIE Vol. 1587 Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors III (1991), page 98-113では、R. E. Kunzは、分岐したのち再び合流し、集積光学機器、たとえば干渉計に特に適した光学導波路を記載している。このような構造は、要素を個々に特定することができず、複数のフォークの連続配置が、第一のフォークで内結合される光波の大きな強さ損失を急速に招くため、減衰的に励起されるルミネセンス計測には適さない。このようなフォークの開き角は小さい（通常は $3^\circ$ ）ため、小型部品の場合のフォークの2本のブランチ間の距離は短いか、そうでなければ、部品の寸法を相応に大きくしなければならず、これは一般に望ましくない。加えて、分岐した波と波との固定相関係はルミネセンス計測に不要である。

#### 【0032】

WO 99/13320では、少なくとも二つの異なる光部分を検出するための

光学センサが特許請求されている。この明細書は主に屈折計測法に関し、計測信号を生成するための蛍光及びりん光法がさらに特許請求されている。同じく多数の分析対象物の測定に関する明細書WO 99/13320では、同じく特許請求されるセンサの同じ物理領域上の多数の「感知パッド」の生成のいくつかの異なる定義（WO 99/13320における命名法に準ずる格子導波路構造）が与えられている。しかし、われわれの明細書における以下の定義に準じる多数の計測区域を、われわれの明細書におけるもう一つの以下の定義に準じる連続変調格子構造上に配置するという示唆はない。さらには、センサプラットフォーム上の計測区域が高密度である場合、特に導波層に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域からの計測光の間の混乱させるクロストークを防ぐ方法が示唆されていない。

#### 【0033】

最大数の異なる計測区域を共通のプラットフォーム上に設けるためにセンサプラットフォームの可能な限りの小型化を達成するためには、この問題の解決が最大に重要である。

#### 【0034】

たとえば、明細書WO 96/35940には、本質的に単モードの平面無機導波路を用いて同時又は順次にルミネセンスベースの多重計測を独占的に実施するため、励起光が別々に投射される少なくとも二つの離散的な導波区域が一つのセンサプラットフォーム上に設けられている配置（アレイ）が考案されている。しかし、センサプラットフォームを離散的な導波区域に分割することから生じる欠点は、共通のセンサプラットフォーム上の離散的導波領域における離散的な計測区域のための比較的大きな空間の必要性であり、この理由のため、ここでもまた、比較的低密度の異なる計測区域（いわゆる「フィーチャ」）しか達成することができない。

#### 【0035】

したがって、フィーチャ密度を増す又は計測区域あたりの所要空間を減らす必要性がある。

#### 【0036】

簡単なガラス又は顕微鏡スライドに基づき、さらなる導波層をもたない、非常に高いフィーチャ密度のアレイが公知である。たとえば、米国特許第5,445,934号 (Affymax Technologies) では、1平方センチメートルでフィーチャ1000個を超える密度のオリゴヌクレオチドのアレイが記載され、特許請求されている。このようなアレイの励起及び読み出しは、従来の光学構造及び方法に基づく。拡大した励起光束を使用するとアレイ全体に照射することができるが、これは、比較的低い感度を示す。散乱光の部分が比較的大きく、また、ガラス基板からの散乱光又はバックグラウンド蛍光は、分析対象物の結合のためのオリゴヌクレオチドが固定化されていない領域で生成される。励起及び検出を固定化されたフィーチャの領域に限定し、隣接領域における光生成を抑制するため、共焦点計測構造が広く使用され、異なるフィーチャが走査によって順次に分析される。しかし、その結果、大きなアレイの読み出しに要する時間が増し、光学装置が比較的複雑になる。

#### 【0037】

したがって、センサプラットフォームの具現化及び薄膜導波路に基づくセンサプラットフォームを用いて達成されてきた同じ高さの感度を達成することができる光学構造及びフィーチャあたりの所要計測面積を同時に最小限にする必要性がある。

#### 【0038】

驚くことに今、導波層 (a) を有するセンサプラットフォーム上の計測区域に隣接する格子構造 (c') に関して特に格子深さの正しいパラメータが選択されるならば、センサプラットフォームの、格子構造 (c) によって励起光が内結合 (インカップル) された導波層 (a) の中に逆結合 (バックカップル) されるルミネセンス光を、短い距離の範囲で、すなわち、何百マイクロメートル内で完全に外結合 (アウトカップル) することでき、ひいては、このルミネセンス光の導波層 (a) 中のさらなる伝播を防ぐことができることがわかった。

#### 【0039】

本発明の本質では、空間的に分けられた計測区域 (d) が、液体サンプル中の一つ又は多数の分析対象物の認識のための、その上に固定化された生物学的もし

くは生化学的領域又は合成の認識要素によって占有される領域によって画定される。これらの領域は、いかなる形状、たとえば点、円、矩形、三角形、楕円又は線の形を有することもできる。隣接計測領域で発生し、層（a）に結合されるルミネセンス光の混乱させるクロストークを防ぐのならば、異なる計測領域を格子構造（c）及び（c'）によって互いに分けることができる。異なる計測領域はまた、共通の連続格子構造上に配置することもできる。これは、結果として、格子の結合効率に依存して、ルミネセンスの混乱させるクロストークの部分的又は完全な防止を提供する。

#### 【0040】

本発明の主題は、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測領域（d）又はいくつかの計測領域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを測定するためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にあり、

励起光を計測領域（d）に内結合するための一つ以上の格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測領域（d）又はいくつかの計測領域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測領域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測領域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

計測領域中又はいくつかの計測領域を含むセグメント中で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測領域又は隣接セグメントへのクロストークが、計測領域又はセグメントに隣接する、ルミネセンス光の外結合のための、格子構造（c）と同じ又は異なる周期の格子構造（c'）によって防止されるセンサプラットフォームである。

#### 【0041】



光学的に透明な導波層に逆結合されるルミネセンス光がこの層の中を等方的に伝播する状態で、一つの同じ格子構造を使用して、励起光を導波層に内結合し、逆結合されたルミネセンス光をこの層から外結合することが可能である。したがって、格子構造(c)又は(c')は、いずれも内結合格子及び外結合格子として使用することができる。さらには、格子構造(c)及び(c')をそれらの機能に関して交換することができる。すなわち、格子構造(c)及び(c')を、内結合及び／又は外結合格子又はその逆として使用することができる。

#### 【0042】

隣接計測区域又はセグメント間での逆結合されたルミネセンス光のクロストークを、誘導される励起光の伝播方向だけでなく、それに対して垂直な方法でも防ぐためには、逆結合されたルミネセンスが光学的に透明な層(a)の中を等方的に延びる状態で、格子構造(c)及び(c')が、横方向に分けられた計測区域(d)又はいくつかの計測区域を含む横方向に分けられたセグメント(d')を取り囲むならば、それは有利である。格子構造(c)及び(c')は、計測区域の周囲に円形、矩形又は多角形の形状に配置されていることが好ましい。

#### 【0043】

最も簡単な実施態様では、格子構造(c)及び(c')は、内結合される励起光の伝播方向だけで計測区域又はセグメントに隣接する。すると、格子構造(c)及び(c')の格子線が好ましくは互いに対して平行になる。特に、格子構造(c)及び(c')は、いくつかの計測区域又はセグメントが位置する共通の連続格子構造を形成することができる。

#### 【0044】

すでに内結合の位置にある適切な格子構造(c)によって励起光及び逆結合されたルミネセンス光の両方を外結合することができるため(内結合及び外結合の効率は本質的に格子深さの適切な選択によって決まる)、共通の格子構造上で計測区域の非常に高い密度を達成することができる。達成可能な密度は、本質的に、生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素の固定化によって達成することができる最小スポットサイズによって決まる。センサプラットフォームは、横方向長さ数センチの面積を有することができる。したがって、二次元構造では、一つ

のセンサプラットフォーム上に100,000個までの計測区域を設けることができる。一つの計測区域は、0.001~6 mm<sup>2</sup>の面積を有することができる。

#### 【0045】

したがって、本発明のもう一つの主題は、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域(d)又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント(d')からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層(a)が、層(a)よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層(b)の上にあり、

励起光を計測区域(d)に内結合するための、少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント(d')の面積において連続的に変調する格子構造(c)を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域(d)又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント(d')を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素(e)を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層(a)に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造(c)によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプラットフォームである。

#### 【0046】

本発明のセンサプラットフォームのこの実施態様はさらに、内結合角が満たされる、すなわちほとんど消失すると、励起光がセンサプラットフォームの背面から発される、すなわち光学的に透明な層(b)に入り、格子構造に向けられると

き、光学系におけるルミネセンス励起に影響しない励起光の最小化を生じさせるという利点を特徴とする。透過光の消失及び異常な「反射」の同時出現の物理的条件は、D. Rosenblattらの「Resonant Grating Waveguide Structures」IEEE Journal of Quantum Electronics, vol. 33 (1997) 2038-2059に例示され、記載され、説明されている。

【0047】

感度に対する要求が緩和される用途の場合、励起光が内結合条件で投射されず、計測区域に対する直接又は透過光照射の簡単な構造にあるならば、それは有利であることができる。同じくこの構造では、光学（層別）導波路）の近フィールドでルミネセンスが増強され、再び、格子構造によって信号を外結合することにより、隣接する計測区域からの信号の光学クロストークなしで高いフィーチャ密度を達成することができる。

【0048】

したがって、本発明の主題はまた、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上のセグメント（d'）からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にあり、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少な

くとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層(a)に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域の面積において連続的に変調する格子構造(c)によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプラットフォームである。

#### 【0049】

多くの用途の場合、特に生物学の分野で、対照物質を使用する参照又は校正のため、異なる励起波長の励起ならびに異なる励起波長及び同様なもしくは異なる発光波長のルミノフォア又は同様な励起波長の励起光ならびに異なる発光波長のルミノフォアを使用することが望まれる。

#### 【0050】

その場合、二つ以上の計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造が、異なる波長の励起光の内結合のための異なる周期数の二つ以上の格子構造を重ね合わせたものであり、格子ラインが互いに対して平行又は非平行、好ましくは非平行に向き、二つの重ね合わせた格子構造の場合、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直であるならば、それは有利である。

#### 【0051】

光学導波層(a)中で誘導されるモードの伝播損失の量は、下にある支持層の表面粗さ及びこの支持層に含まれるかもしれないクロモフォアの吸収によって多大な程度まで決まる。これはさらに、層(a)中で誘導されるモードの減衰フィールドの浸透(この支持層への)により、この支持層における不要なルミネセンスの励起の危険を伴う。さらには、光学的に透明な層(a)及び(b)の熱膨張率の違いによって熱的応力が発生することがある。たとえば透明な熱可塑性プラスチックからなる化学的に高感度で光学的に透明な層(b)の場合、層(b)を攻撃するかもしれない溶媒の、光学的に透明な層(a)の微孔への浸透を防ぐことが望ましい。

#### 【0052】

したがって、層(a)よりも低い屈折率を有し、層(a)と接触しており、厚

さ5 nm～10000 nm、好ましくは10 nm～1000 nmのさらなる光学的に透明な層（b'）が光学的に透明な層（a）と（b）との間に位置しているならば、それは有利である。中間層の目的は、層（a）の下表面粗さの軽減又は層（a）中で誘導される光の減衰フィールドの、下に位置する一つ以上の層への浸透の軽減又は下に位置する一つ以上の層への層（a）の付着の改善又は光学センサプラットフォーム内で熱的に誘発される応力の軽減又は層（a）の微孔を下に位置する層に対してシールすることによる、下に位置する層からの光学的に透明な層（a）の化学的分離である。

#### 【0053】

生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素を光学的に透明な層（a）に被着させる方法は数多くある。たとえば、被着は、物理的吸着又は静電氣的相互作用によって実施することができる。一般に、その場合の認識要素の向きは静的性質である。さらには、分析対象物を含有するサンプル及び分析過程で加えられる試薬が異なる組成を有するならば、固定化された認識要素の一部が洗い落とされる危険がある。したがって、生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素の固定化のために、付着促進層（f）が光学的に透明な層（a）に被着されるならば、それは有利であることができる。この付着促進層はもまた、透明であるべきである。特に、付着促進層の厚さは、導波層（a）を出てその上に位置する媒体に入る減衰フィールドの浸透深さを超えるべきではない。したがって、付着促進層（a）は、200 nm未満、好ましくは20 nm未満の厚さを有するべきである。付着促進層は、たとえば、シラン、エポキシド及び「自己組織化官能化単層」からなる群の化合物を含むことができる。

#### 【0054】

計測区域の定義で述べたように、横方向に分けられた計測区域（d）は、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素をセンサプラットフォーム上に横方向に選択的に被着させるによって生成することができる。発光することができる分析対象物又は固定化された認識要素との結合を求めて分析対象物と競合する発光で印された分析対象物類似体又は多工程検定における発光で印された結合相手と接触させられると、発光することができるこれらの分子は、固定化された認識要

素によって占有された区域によって画定される計測区域だけで選択的にセンサプラットフォームの表面に結合する。

#### 【0055】

生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素を被着させるためには、平行又は交差マイクロチャネルに供給することにより、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルの印加により、インクジェットスポッティング、機械的スポッティング、マイクロコンタクトプリント、計測区域と生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素との流体接触からなる方法の群の一つ以上の方法を適用することができる。

#### 【0056】

核酸（DNA、RNA、...）及び核酸類似体（PNA、...）、抗体、アプタマー、膜結合し、単離された受容体、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成された空洞などを、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として被着させることができる。

#### 【0057】

最後に挙げたタイプの認識要素は、「分子インプリンティング」として文献に記載された方法によって製造される空洞をいう。この手法では、大部分は有機溶液中の分析対象物又は分析対象物類似体をポリマー構造中に封入する。すると、これが「インプリント」と呼ばれる。そして、適切な試薬の添加により、分析対象物又はその類似体をポリマー構造から溶解させ、ポリマー構造中に空洞を残す。そして、この空洞を、分析対象物測定のための方法で、高い立体選択性をもつ結合サイトとして使用することができる。

#### 【0058】

また、全細胞又は細胞断片を生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として被着させることができる。

#### 【0059】

多くの場合、いわゆる非特異的結合によって生じる信号、すなわち、たとえば疎水性吸着又は静電的相互作用によって、提供された固定化された生物学的も

しくは生化学的又は合成認識要素の区域で拘束されるだけでなく、これらの認識要素によって占有されないセンサプラットフォームの区域でも拘束される分析対象物又は分析対象物測定に加えられる他の成分の結合によって生じる信号による分析方法の検出限界。したがって、非特異的結合又は吸着を最小限にするため、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物が横方向に分けられた計測区域（d）の間に被着されるならば、それは有利である。「化学的に中性の」化合物としては、分析対象物又は分析対象物の類似体又は多工程検定におけるさらなる結合相手の認識及び結合のための特異的結合場所を有さず、その存在のため、分析対象物又はその類似体又はさらなる結合相手のセンサプラットフォームの表面へのアクセスを阻止するような化合物がそう呼ばれる。

#### 【0060】

たとえばウシ血清アルブミン又はポリエチレングリコールからなる群の化合物を「化学的に中性の」化合物として被着することができる。

#### 【0061】

多くの用途の場合、格子構造（c）が均一な周期の回折格子であるならば、それは有利である。その場合、格子構造（c）によって励起光を計測区域に向けて内結合するための共振角は、格子構造の全区域で均一である。しかし、有意に異なる波長の異なる光源からの励起光を内結合することを意図するならば、内結合のための対応する共振角は大きく異なることができ、センサプラットフォームを収容する光学系の中のさらなる調節用部品の必要性又は空間的に非常に不適当な結合角につながるおそれがある。たとえば結合角の大きな違いを減らすためには、格子構造（c）が多重回折格子であるならば、それは有利であることができる。

#### 【0062】

励起光束の平行性及び共振角の正確な調節に対する要求を軽減するため、格子構造（c）が、層（a）中の内結合された光の伝播方向に対して平行又は垂直に、横方向に変化する周期数を有するならば、それは有利であることができる。そして、大きな区域を照射する収束的又は散開的に投射される光束から、格子構造上の、共振条件が満たされる場所で内結合が起こる。

## 【0063】

特に、層（a）中の内結合された光の伝播方向に対して平行又は垂直に横方向に変化する周期数を有するそのような格子構造は、一つ以上のルミネセンスの測定他に、計測区域における有効屈折率の変化を測定する方法を可能にする。この方法に関して、一つ以上のルミネセンス及び／又は励起波長の光信号の測定が偏光選択的な方法で実施されるならば、それは有利であることができる。

## 【0064】

信号バックグラウンド比を改善するために、一つ以上のルミネセンスが、励起光の偏光とは異なる偏光で計測されるならば、さらにそれは有利であることができる。

## 【0065】

第二の光学的に透明な層（b）の材料は、石英、ガラス又はたとえばポリカーボネート、ポリイミドもしくはポリメチルメタクリレートからなる群の透明な熱可塑性プラスチックを含むことができる。

## 【0066】

光学的に透明な層（a）の表面に可能な限り強い減衰フィールドを発生させるためには、光学的に透明な導波層（a）の屈折率が隣接層の屈折率よりも有意に高いことが望ましい。第一の光学的に透明な層（a）の屈折率が2よりも高いならば、それは特に有利である。

## 【0067】

第一の光学的に透明な層（a）は、たとえば、 $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$ 又は $ZrO_2$ を含むことができる。第一の光学的に透明な層（a）が $TiO_2$ 又は $Ta_2O_5$ を含むならば、それは特に好ましい。

## 【0068】

光学的に透明な導波層（a）の屈折率の他にも、その厚さが、より低い屈折率の隣接層との界面でできるだけ強い減衰フィールドを発生させるための第二の重要なパラメータである。層厚さが少なくとも一つの励起波長モードを誘導するのに十分である限り、導波層（a）の厚さの減少とともに減衰フィールドの強さが増す。それにより、モードを誘導するための最小「カットオフ」層厚さは、この



モードの波長に依存する。「カットオフ」層厚さは、短めの波長の光の場合よりも長めの波長の光の場合の方が大きい。しかし、「カットオフ」層厚さに近づくと、望まれない伝播損失もまた強く増大し、それにより、さらに、好ましい層厚さの選択の下限をセットする。

#### 【0069】

好ましいものは、所与の励起波長で一つから三つのモードだけを誘導することができる光学的に透明な層（a）の層厚さである。特に好ましいものは、この所与の励起波長で単モード導波路を提供する層厚さである。誘導される光の離散的（不連続的）モードの特性は横モードだけに関することを理解しなければならない。

#### 【0070】

これらの要件の結果として、第一の光学的に透明な層（a）の厚さは、好ましくは40～300 nmである。第一の光学的に透明な層（a）の厚さが70～160 nmであるならば、それは特に有利である。

#### 【0071】

光学的に透明な導波層（a）及び隣接層の屈折率が所与であると、上記共振条件にしたがって励起光を内結合するための共振角は、内結合される回折オーダー、励起波長及び格子周期に依存する。第一の回折オーダーの内結合は、内結合効率を増すのに有利である。内結合効率の量のためには、回折オーダーの数の他に、格子深さが重要である。原則として、結合効率は、格子深さが増すとともに増大する。しかし、外結合の過程が内結合に対して完全に逆であるため、外結合効率が同時に増し、その結果、格子構造（c）又はそれに隣接して位置する計測区域（d）におけるルミネセンスの励起に最適値が得られる。この最適値は、計測区域及び投射される励起光束の形状に依存する。これらの境界条件に基づき、格子（c）が200 nm～1000 nmの周期を有し、3 nm～100 nm、好ましくは10 nm～30 nmの変調深さを有するならば、それは有利である。

#### 【0072】

以下、本発明の実施態様で例示するように、励起光及び／又は逆結合されたルミネセンス光の不完全な内結合及び外結合により、連続格子構造上で、一つの計

測区域内又はいくつかの計測区域にまたがって、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に誘導される励起光及び／又は発生するルミネセンス光の強さのプラス勾配を生成することが可能であり、この勾配は、格子深さによって制御することができる。この勾配は、拡張された本質的に平行な励起光束によって内結合条件下で同時に照射される格子構造の各区域に沿って内結合された励起光の伝播方向にさらに内結合される励起光の量よりも小さい励起光の一部の外結合から生じる。これらの条件下で、その結果として、全体で利用可能な励起光の強さは、誘導される光の伝播方向に、連続格子構造上の照射区域の端部に向かって増大する。利用可能な励起光の強さのこの勾配は、ダイナミックレンジの拡張に利用することができるという利点を有する。

#### 【0073】

所与の残りのパラメータに関して、内結合及び外結合の効率は、本質的には格子深さによって決まる。したがって、格子(c)が内結合される励起光の伝播方向に対して平行に横方向に変化する格子深さを有するならば、誘導される励起光及び／又は励起されるルミネセンス光の強さの該勾配をさらに影響し、制御することができる。

#### 【0074】

対照的に、内結合される励起光の、光学的に透明な導波層の中での伝播損失は、その伝播方向に沿って、誘導される励起光のマイナスの勾配につながる。相應に、光学的に透明な層(a)における伝播損失の程度によって制御することができる一つの計測区域内及び／又はいくつかの計測区域にかけて誘導される励起光及び／又は発生したルミネセンス光の強さのマイナス勾配を、内結合される励起光の伝播方向に対して平行に生成することが可能である。伝播損失の程度は、たとえば、発生させるルミネセンスに干渉しない吸収性分子で導波層を特定にドーピングすることによって、又はそのような吸収性分子を導波層に被着させることによって調整することができる。

#### 【0075】

さらには、第一の光学的に透明な層(a)の厚さに対する格子の変調深さの比は0.2以下であることが好ましい。

## 【0076】

そのため、格子構造(c)は、矩形、三角形又は半円形の断面のレリーフ格子であることもできるし、本質的に平面的な光学的に透明な層(a)における周期変調を有する位相又は容積格子であることもできる。

## 【0077】

さらには、ルミネセンスの増強又は信号ノイズ比の改善のためには、好ましくは金又は銀の薄い金属層が、光学的に透明な層(a)と、層(a)よりも低い屈折率の、場合によっては、たとえばシリカ又はフッ化マグネシウムのさらなる誘電層の上に固定化された生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素との間に被着され、金属層及び場合によるさらなる中間層の厚さが、励起波長及び／又はルミネセンス波長で表面プラズモンを励起することができるような方法で選択されるならば、それは有利であることができる。

## 【0078】

さらには、光学系における調節の簡素化及び／又は分析系の一部としてのサンプル区画の接続のための光学的又は機械的に認識可能な印がセンサプラットフォーム上に設けられるならば、それは有利であることができる。

## 【0079】

本発明のもう一つの主題は、  
少なくとも一つの励起光源と、  
上記実施態様の少なくとも一つのセンサプラットフォームと、  
センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域(d)から発する光を収集するための少なくとも一つの検出器と  
を含む、一つ以上のルミネセンスを測定するための光学系である。

## 【0080】

感度に対して非常に高い要求のない用途の場合、励起光が直接又は透過照射の簡単な配置で計測区域に投射されるならば、それは有利であることができる。このような配置は、光学系における本発明のセンサプラットフォームの配置に対する有意に軽減された要求と関連する。特に、このような配置は、多くの市販ルミネセンス励起及び検出系、たとえばスキャナ系におけるセンサプラットフォーム

の使用を可能にする。そのため、ルミネセンス光の検出は、格子構造 (c) 又は (c') によって外結合されるルミネセンスが同じく検出器によって収集されるような方法で実施されることが好ましい。

#### 【0081】

しかし、最も深い検出限界を達成するためには、励起光が内結合条件下で格子構造 (c) 又は (c') に投射されるならば、それは有利である。

#### 【0082】

そのため、少なくとも一つの光源から発される励起光がコヒーレントであり、光学的に透明な層 (a) への結合のための共振角で一つ以上の計測区域に投射されるならば、それは有利である。

#### 【0083】

多数の計測区域又はすべての計測区域を同時に励起し、そこからルミネセンスを同時に収集するためには、少なくとも一つの光源からの励起光を光線拡大光学部品によって本質的に平行な光線に拡大し、一つ以上の計測区域に投射することが好ましい。投射は、好ましくは、光学的に透明な層 (a) に結合するための共振角で実施される。

#### 【0084】

しかし、計測区域の外側から発するルミネセンス信号を減らすためには、少なくとも一つの光源からの励起光が、回折光学要素又は、光源が多数ある場合には、好ましくはDammann格子である多数の回折光学要素又は好ましくはマイクロレンズアレイである屈折光学要素によって可能な限り均一な強さの複数の個々の光線に分割され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、横方向に分けられた計測区域に投射されるならば、それはまた有利であることができる。

#### 【0085】

一つの光源の強さが不十分である場合又はたとえば生物学的用途のために異なる発光波長をもつ光源が必要である場合、同様な又は異なる発光波長の二つ以上のコヒーレント光源が励起光源として使用されるならば、それは有利である。異なる発光波長の光源の場合、二つ以上のコヒーレント光源からの励起光が異なる方向から同時又は順次に、異なる周期数の格子構造を重ね合わせたものを含む格

子構造(c)に投射されるならば、それは有利である。

【0086】

多数の計測区域からの信号を別々に記録するためには、横方向に解像する検出器を信号検出に使用することが好ましい。そのため、たとえばCCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャネルプレート及びマルチチャネル光電子増倍管からなる群の少なくとも一つの検出器を、少なくとも一つの横方向に解像する検出器として使用することができる。

【0087】

本発明の光学系では、前記実施態様のいずれかにしたがって、伝送された光束を成形するためのレンズもしくはレンズ系、光束を偏向させ、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲したミラー、光束を偏向させ、場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の部分をスペクトル選択的に偏向させるための二色性ミラー、伝送される光の強さを調整するためのニュートラルフィルタ、光束の部分をスペクトル選択的に透過させるための光学フィルタもしくはモノクロメータ又は励起もしくはルミネセンス光の離散的な偏光方向を選択するための偏光選択要素からなる群の光学部品を、一つ以上の励起光源と前記実施態様のいずれかのセンサプラットフォームとの間及び／又は該センサプラットフォームと一つ以上の検出器との間に配置することができる。

【0088】

多くの用途の場合、励起光が1 fsec~10 minの間隔のパルスで投射されるならば、それは有利である。

【0089】

運動計測のため、又はサンプル又は光学系もしくはセンサプラットフォームそのものの材料中の蛍光汚染物からの高速減衰蛍光の区別のためには、計測区域からの発光が時間分解的に計測されるならば、それは有利であることができる。

【0090】

さらには、本発明の光学系が、計測区域の他にも、参照のため、光源の位置での励起光又は拡大後の励起光又は個々のビームに分割された後の励起光、一つ以

上の横方向に分けられた計測区域の位置からの励起波長の散乱光及び格子構造（c）によって外結合された励起波長の光からなる群の光信号を計測するための部品を含むことが好ましい。そのため、発光の測定のための計測区域と基準信号の測定のための計測区域とが同一であるならば、それは特に有利である。

#### 【0091】

励起光の投射及び一つ以上の計測区域からの発光の検出はまた、一つ以上の計測区域で順次に実施することもできる。そのため、ミラー、偏向プリズム及び二色性ミラーからなる群の可動光学部品を使用して、順次の励起及び検出を実施することができる。通常、励起光線が、たいていは可動ミラーにより、分析される区域にわたって順次に走査される生物分析アレイイメージング系における順次励起及び検出には、市販のいわゆるスキャナが使用される。大部分の走査系の場合、非照射区域と励起光線との間の角度が変化する。しかし、励起光線を本発明のセンサプラットフォームの導波層に内結合する共振条件を満たすためには、この角度が本質的に一定のままであるべきである。すなわち、本発明の光学系で実現されるスキャナは、角度保存的に機能しなければならない。この要件は、いくつかの市販のスキャナによって満たされる。しかし、同時に、センサプラットフォーム上の励起区域の大きさを変更すべきではない。したがって、本発明のもう一つの主題は、本質的に焦点及び角度保存的なスキャナを使用して順次の励起及び検出が実施される光学系である。

#### 【0092】

もう一つの実施態様では、センサプラットフォームは、順次の励起及び検出の過程の間で動かされる。この場合、一つ以上の励起光源及び検出に使用される部品は、空間的に固定された位置に配置することができる。

#### 【0093】

本発明の主題はまた、センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域上の少なくとも一つのサンプル中の一つ以上の分析対象物をルミネセンス検出によって測定するための、

前記実施態様のいずれかのセンサプラットフォームと、

前記実施態様のいずれの光学系と、

一つ以上のサンプルをセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段とを含む完全な分析系である。

【0094】

分析系が、一つ以上の計測区域又はセグメントに組み合わされた計測区域の区域に少なくともある、センサプラットフォームに向けて開口した一つ以上のサンプル区画をさらに含むならば、それは有利である。そのため、サンプル区画それぞれは、 $0.1\text{ nl} \sim 100\text{ }\mu\text{ l}$ の容積を有する。

【0095】

センサプラットフォームは、閉流系及び開放系のいずれで作動させることもできる。最初の場合、分析系は、サンプル区画が、光学的に透明な層（a）とは反対側にある、サンプルの供給又は吐き出しのための入口及び／又は出口を除き、閉じられるような方法で構成され、サンプル及び場合によってはさらなる試薬の供給又は吐き出しが系を通して閉鎖流で実施され、共通の入口及び出口開口を有するいくつかの計測区域又はセグメントへの液体供給の場合、これらの開口は、好ましくは、行ごと又は列ごとに指定される。

【0096】

開口系の場合、本発明の分析系は、サンプル区画が、光学的に透明な層（a）にとは反対側に、サンプル又は他の試薬の場所指定供給又は取り出しのための開口を有するような方法で構成されている。さらには、一つ以上の分析対象物の測定と検定の間に湿潤され、計測区域と接触させられる試薬のための区画を設けてもよい。

【0097】

本発明のさらなる主題は、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを測定するための、センサプラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域上の一つ以上のサンプル中の一つ以上の分析対象物のルミネセンス検出による測定方法であって、

第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にあり、

励起光を計測区域（d）に内結合するための一つ以上の格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

計測区域又はいくつかの計測区域を含むセグメントで発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークを、計測区域又はセグメントに隣接する、ルミネセンス光の外結合のための、格子構造（c）と同じ又は異なる周期の格子構造（c'）によって防ぐ方法である。

#### 【0098】

特に、本発明の主題は、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを同時に測定するための、センサプラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域上の一つ以上のサンプル中の一つ以上の分析対象物のルミネセンス検出による同時測定の方法であって、

第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にあり、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し



、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークを、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造（c）によってこのルミネセンス光を外結合することによって防ぐ方法である。

#### 【0099】

このため、計測区域の励起光を格子構造（c）によって光学的に透明な層に結合することが好ましい。

#### 【0100】

本発明の上記方法は、（1）等方向に発せられたルミネセンス又は（2）光学的に透明な層（a）に逆結合され、格子構造（c）によって外結合されるルミネセンス又は両方の部分（1）及び（2）のルミネセンスを同時に計測することを可能にする。

#### 【0101】

また、本発明の主題は、上記実施態様のいずれかの光学系を、上記実施態様の少なくとも一つのセンサプラットフォームとともに含む上記実施態様のいずれかの分析系を使用して、ルミネセンス検出によって一つ以上の分析対象物を測定する方法であって、一つ以上の分析対象物に関して試験される一つ以上の液体サンプルをセンサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域と接触させ、サンプル中又は計測区域上の、発光することができる化合物を励起してルミネセンスを発させ、その発せられたルミネセンスを計測する方法である。

#### 【0102】

さらなる展開された実施態様として、一つの計測区域内及び／又はいくつかの計測区域にかけて内結合される励起光の伝播方向に対して平行に誘導される励起

光及び／又は励起ルミネセンス光の制御可能な勾配によって信号計測及び／又は分析対象物定量のダイナミックレンジを増大又は抑制することができる方法の特許請求する。

#### 【0103】

ルミネセンス又は蛍光の発生のために、本発明の方法では、励起されることができ、300 nm～1100 nmの波長で発光するルミネセンス又は蛍光標識を使用することができる。ルミネセンス又は蛍光標識は、従来のルミネセンス又は蛍光染料であってもよいし、半導体に基づく発光又は蛍光ナノ粒子であってもよい（W. C. W. Chan及びS. Nieの「Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection」 Science 281 (1998) 2016-2018）。

#### 【0104】

ルミネセンス標識は、分析対象物に結合することもできるし、競合検定では、分析対象物類似体に結合することもできるし、多工程検定では、固定化された生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素の結合相手の一つ又は生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素に結合することもできる。

#### 【0105】

さらには、第一のルミネセンス標識と同種又は異なる励起波長の第二又はそれ以上のルミネセンス標識及び同種又は異なる発光波長を使用することができる。これにより、第二又はそれ以上のルミネセンス標識が、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起されることができ、他の波長で発光するならば、それは有利であることができる。

#### 【0106】

他の用途では、加えられる発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルとが重複しないか、部分的にしか重複しないならば、それは有利であることができる。

#### 【0107】

本発明の方法では、供与体として働く第一の発光染料から受容体として働く第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動を分析対象物の検出に使用するならば、それはさらに有利であることができる。

#### 【0108】

さらには、一つ以上のルミネセンスの測定他に、計測区域における有効屈折率の変化を測定するならば、それは有利であることができる。それにより、一つ以上のルミネセンス及び／又は励起波長での光信号の測定が偏光選択的に実施されるならば、それはさらに有利であることができる。さらには、方法は、励起光の偏光とは異なる偏光で一つ以上のルミネセンスを計測することを可能にする。

#### 【0109】

本発明の方法は、抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジンタグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNAもしくはRNAストランド、DNAもしくはRNA類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物からなる群の一つ以上の分析対象物の同時又は順次、定量的又は定性的測定を可能にする。

#### 【0110】

試験するサンプルは、天然の体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄であることができる。

#### 【0111】

試験するサンプルはまた、光学的に濁った液体、表面水、土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであることができる。

#### 【0112】

試験するサンプルはまた、生物学的組織から採取することができる。

#### 【0113】

本発明のさらなる主題は、薬学研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発における化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の選抜法での決定、親和性選抜及び研究におけるリアルタイム結合研究及び運動パラメータの決定、定性的及び定量的な分析対象物測定、特にDNA及びRNA分析論、医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における毒性発生研究及び発現プロファイルの決定及び抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、医薬品開発及び治療薬選択における患者の層別化、食品及び環境分析論における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、上記実施態様のいずれかの方法の使用である。

## 【0114】

以下の例で本発明をさらに説明し、実証する。

## 【0115】

## 例1

a) 二つの別個の格子構造ならびに多数の計測区域及び複数の計測区域の1つのセグメントを有するセンサプラットフォーム

幅16 mm×長さ48 mm×厚さ0.5 mmの外寸のセンサプラットフォームを使用した。基材（光学的に透明な層（b））は、Corningガラス7059（488 nmでの屈折率 $n = 1.538$ ）からなるものであった。スピコートによって被着されたフォトレジストで覆われた導波層（a）をホログラフィー露光したのち、センサプラットフォーム上に形成されない区域をマスキングしながら湿式化学エッチングすることにより、周期320 nm及び格子深さ12+/-3 nmの表面レリーフ格子の二つの構造を基材中に生成した。格子は、それぞれ長さ5 mm×幅12 mm（格子構造I）及び長さ1 mm×幅12 mm（格子構造II）の寸法であり、格子線がセンサプラットフォームの所与の幅に対して平行な向きにあった。20 mmの内側距離で励起光を内結合し、導波層（a）中で誘導するため、格子構造をセンサプラットフォーム上でそれらの内側に関して中心対称に配置した。イオンめっきしたのち、300℃で焼き戻す（テンパリング）ことにより、光学的に透明な層（b）上に光学的に透明な導波層（a）を形成すると（R. E. Kunz、J. Edlingerらの「Grating couplers in tapered waveguides for integrated optical sensing」 Proc. SPIE vol. 2068 (1994), page 321を参照）、488 nmで2.317の屈折率を示した（層厚さ150 nm）。格子構造が被着法によって一定の比にしたがってほぼ1:1で移される導波層（a）の格子深さを後でAFM（原子間力顕微鏡）によって制御した。以下の例（4. b）計測法では、格子構造（I）を、励起光を上部の計測区域、格子構造（I）と（II）との間に位置する計測区域にそれぞれ内結合するための連続格子構造として使用した。セグメントを形成する後者の計測区域は、誘導され、逆結合されたルミネセンス光及び誘導された励起光の、格子構造（II）による外結合により、この場合は外結合格子として働く格子構造（II）よりも上に位置する可能なさらなる計測区域

又はセグメントへのクロストークを防止される。

#### 【0116】

生化学的もしくは生物学的又は合成の認識要素の固定化の準備として、センサプラットフォームを清浄し、エポキシシランによって液相中でシラン化した（オルト-キシレン 500 ml 中 10 ml（2% v/v）3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン及び 1 ml（2% v/v）N-エチルジイソプロピルアミン（ $d = 0.881 \text{ g/cm}^3$ 、 $m = 440.59$ ））。次に、16マーオリゴヌクレオチド（ $\text{NH}_2-3' \text{CAACACACCTTAACAC}-5'$ 、被着溶液の濃度：0.34 mM、スポットあたり 3 nl）の溶液を市販のスポットで被着し、それにより、格子構造（I）上及び格子構造（I）及び（II）の間の区域に直径 140～150  $\mu\text{m}$  のほぼ円形の計測区域を 600  $\mu\text{m}$  の距離（中心間）の 6×6 アレイに生成した。

#### 【0117】

b) 連続格子構造上に多数の感知区域を有するセンサプラットフォーム

幅 16 mm×長さ 48 mm×厚さ 0.7 mm の外寸のセンサプラットフォームを使用した。基材（光学的に透明な層（b））は、AF45 ガラス（633 nm での屈折率  $n = 1.52$ ）からなるものであった。スピコートによって被着されたフォトレジストで覆われた導波層（a）をホログラフィー露光したのち、湿式化学エッチングすることにより、周期 364 nm 及び格子深さ  $25 \pm 5 \text{ nm}$  の表面レリーフ格子の連続構造を基材中に生成した。格子線は、センサプラットフォームの所与の幅に対して平行になる向きであった。反応性磁場増強 DC スパッタリング（DE4410258 を参照）により、光学的に透明な層（b）上に光学的に透明な  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  導波層（a）を生成すると、633 nm で 2.15 の屈折率を示した（層厚さ 150 nm）。格子構造が被着法によって一定の比にしたがってほぼ 1:1 で移される導波層（a）の格子深さを後で AFM（原子間力顕微鏡）によって制御した。

#### 【0118】

生化学的もしくは生物学的又は合成の認識要素の固定化の準備として、上記のように、センサプラットフォームを清浄し、エポキシシランによって液相中でシ

ラン化した。そして、16マーオリゴヌクレオチド（被着溶液の濃度：0.34 mM、スポットあたり3 nl）の溶液を市販のスポットで被着し、それにより、連続格子構造上に直径140～150  $\mu\text{m}$ のほぼ円形の計測区域を600  $\mu\text{m}$ の距離（中心間）の6×6アレイで生成した。

#### 【0119】

#### 例2

#### 光学系

#### a) 励起モジュール

例1aで記載したセンサプラットフォームへの内結合のため、センサプラットフォームをコンピュータ制御調節モジュールに取り付けて、格子線に対して平行及び垂直な並進ならびに格子構造（I）に投射される励起光線によって照射される区域の主軸に運動中心をもつ回転を可能にした。励起光源として働くレーザの直後に、計測データを収集しないときに光路を遮るためのシャッタを光路中に設けた。さらには、励起光の強さを段階的又は連続的に変えるため、ニュートラルフィルタ又は偏光子を、励起光路中のこの位置又は他の位置にセンサプラットフォームに向けて取り付けた。

#### 【0120】

#### 励起モジュールa. i) / センサプラットフォーム1. a)

さらなる光線成形部品を使用することなく、ヘリウムネオンレーザ（2 mW）から励起光線を格子構造Iの右エッジに投射した。励起光線スポットの大きさは、励起レーザ光線の直径と一致した。センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内結合モード沿いの散乱によって発される散乱光の最大強さによって確認した。この最大値は、目視検査によって決定することもできるし、イメージングシステムによって収集された励起モードに沿いの散乱光を、CCDカメラの画素のような光電子検出器、たとえば横方向に解像する検出器又はフォトダイオード、たとえば横方向に解像しない検出器にイメージングすることによって決定することもできる。同じ内結合条件の下、誘導励起光のための第二の格子構造IIの外結合角で配置された第二の光電子検出器によって最大信号を計測した。内結合の共振角として $-3.8^\circ$ の角度を測定した。

## 【0121】

励起モジュール a. ii) / センサプラットフォーム 1. a)

円柱形レンズを含むレンズの組み合わせにより、ヘリウムネオンレーザ (2 mW) からの励起光線を、スリット型断面 (センサプラットフォームの格子線に対して平行) をもつ光ビームに拡大した。格子線に対して平行にわずかに散開するが、格子線に対して直交する投射で平行である励起光束の上下の境界領域をスリットによってマスクした。格子構造上のスリット型断面をもつ得られた光束を格子構造 I の右エッジに向けた。励起光は、長さ 1 mm × 幅 12 mm のサイズであった。センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内結合モード沿いの散乱によって発される散乱光の最大強さによって確認した。この最大値は、目視検査によってけっていすることもできるし、イメージングシステムによって収集された励起モードに沿いの散乱光を、CCDカメラの画素のような光電子検出器、たとえば横方向に解像する検出器又はフォトダイオード、たとえば横方向に解像しない検出器にイメージングすることによって決定することもできる。同じ内結合条件の下、誘導励起光のための第二の格子構造 II の外結合角で配置された第二の光電子検出器によって最大信号を計測した。内結合の共振角として  $-3.9^\circ$  の角度を測定した。

## 【0122】

励起モジュール a. iii) / センサプラットフォーム 1. a)

Dammann格子により、この格子の線に対して平行な直線配置で、ヘリウムネオンレーザからの励起光を 16 個のビームに分割した。格子バー及び溝の不規則な順序は、製造業者により、すべての偶数回折オーダー、特にゼロオーダーが抑制され、奇数回折オーダーに関して可能な限り均一な強さが達成される (偏差 5 % 未満) ような方法で最適化した。センサプラットフォームに向く方向にある、Dammann格子の背後の非球形レンズ (Dammann格子は該レンズの焦点にある) を使用して、Dammann格子の背後の散開する光線から平行な個々のビームの束を形成した。Dammann格子から出る個々のビームの開き及び背後に位置するレンズの焦点距離を、センサプラットフォーム上の光線の間に所望の間隔が生成されるような方法で均衡させた。

## 【0123】

実例では、使用する Dammann 格子によって 16 個のビームを生成し、そのうち 8 個を、スリット型開口に通したのち、偏向プリズムにより、内結合格子として働く格子構造 I の右エッジに向けた。内結合条件は、内結合され、導波層 (a) 中で誘導される個々のビーム沿いの散乱光の同時最大強さによって確認されたように、8 個の光線に関して同時に満たすことができた。結合角は  $-3.8^\circ$  であった。

## 【0124】

励起モジュール a. iv) / センサプラットフォーム 1. a)

25 倍拡大光学部品により、ヘリウムネオンレーザからの  $632.8 \text{ nm}$  の励起光ビームを、直径  $2 \text{ cm}$  の円形断面の平行光束に拡大した。この励起光束の中央部分から、長さ  $1 \text{ mm} \times$  幅  $9 \text{ mm}$  の区域（格子構造の命名法に準じる）を選択し、格子構造 I の右エッジに投射した（内結合し、誘導する励起光の方向で）。センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内結合モード沿いの散乱によって発される散乱光の最大強さによって確認した。この最大値は、目視検査によって決定することもできるし、イメージングシステムによって収集された励起モードに沿いの散乱光を、CCD カメラの画素のような光電子検出器、たとえば横方向に解像する検出器又はフォトダイオード、たとえば横方向に解像しない検出器にイメージングすることによって決定することもできる。同じ内結合条件の下、誘導励起光のための第二の格子構造 II の外結合角で配置された第二の光電子検出器によって最大信号を計測した。

## 【0125】

内結合の共振角として  $-3.8^\circ$  の角度を測定した。非回折透過励起光の量をセンサプラットフォームの位置の背後でレーザ出力計によって計測した。利用可能な励起強さとして  $88 \mu\text{W}$  の値を測定した（光路中にセンサプラットフォームがない）。透過量は、センサプラットフォームを光路に配置しているが、導波層に内結合しない状態で  $79 \mu\text{W}$  に達した。内結合が起これば、この値は  $21 \mu\text{W}$ 、すなわち、利用可能な全励起光の  $24\%$  に低下した。

## 【0126】



励起モジュール a. v) / センサプラットフォーム 1. a)

25倍拡大光学部品により、ヘリウムネオンレーザからの632.8 nmの励起光ビームを、直径2 cmの円形断面の平行光束に拡大した。この励起光束の中央部分から、長さ4 mm×幅9 mmの区域（格子構造の命名法に準じる）を選択し、まず格子構造 I の右エッジに向けた（内結合し、誘導する励起光の方向）。センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内結合モード沿いの散乱によって発される散乱光の最大強さによって確認した。内結合の共振角として $-4^\circ$ の角度を測定した。そして、センサプラットフォームを、励起光によって照射される長さ4 mmの区域が長さ5 mmの格子構造の中心に位置するまで、角度を変えずに横方向に並進させた。非回折透過励起光の量をセンサプラットフォームの位置の背後でレーザ出力計によって計測した。利用可能な励起強さとして $250 \mu\text{W}$ の値を測定した（光路中にセンサプラットフォームがない）。透過量は、センサプラットフォームを光路に配置しているが、導波層に内結合しない状態で $240 \mu\text{W}$ に達した。内結合が起これば、この値は $51 \mu\text{W}$ 、すなわち、利用可能な全励起光の20%に低下した。

【0127】

b) 検出モジュール

(i) 多数の計測区域からの同時信号記録 (Ausmessung) のための検出系

(I) ベルチェ冷却（作動温度 $-30^\circ\text{C}$ ）を備えたCCDカメラ (TE3/A Astro cam、英国Cambridge) を横方向解像検出器として使用した。35 mmのニコン対物レンズ (Nikkor 35 mm) によってCCDチップに対する信号収集及び合焦を実施した。中心波長679 nm及び帯域幅25 nmの干渉フィルタ (Omega Optical、バーモント州Brattleborough) 2個を対物レンズとCCDチップとの間、干渉フィルタの効率を有意に損なわない、光路のわずかに収束する部分に配置した。ハイブリダイゼーション緩衝液の供給によって収集した横方向に解像された信号を、発光トレーサプローブなしで、相補的な発光標識トレーサ分子とのハイブリダイゼーションによるルミネセンス信号に関して時間的にずらして、バックグラウンド信号の測定及び参照の両方に使用した。

【0128】

(II) ペルチェ冷却（作動温度 $-30^{\circ}\text{C}$ ）を備えたCCDカメラ（TE3/A Astrocam、英国Cambridge）を横方向解像検出器として使用した。Heligon Tandem対物レンズ（Rodenstock、 $2\times X R$  Heligon  $1.1/50\text{mm}$ ）によってCCDチップに対する信号収集及び合焦を実施した。中心波長 $679\text{nm}$ 及び帯域幅 $25\text{nm}$ の干渉フィルタ（Omega Optical、バーモント州Brattleborough）2個ならびにニュートラルフィルタ（減衰した散乱励起光及びはるかに弱いルミネセンス光を計測区域から伝送するため）又はニュートラルフィルタと干渉フィルタとの組み合わせ（減衰した励起光を計測区域から伝送するため）を、Heligon Tandem対物レンズの二つの部分の間でフィルタホイールに取り付けた。励起及びルミネセンス波長の信号を交互に計測した。

#### 【0129】

(III) ペルチェ冷却（作動温度 $-30^{\circ}\text{C}$ ）を備えたCCDカメラ（TE3/A Astracam、英国Cambridge）を横方向解像検出器として使用した。前記例と同様、Heligon Tandem対物レンズによってCCDチップに対する信号収集及び合焦を実施した。Heligon Tandem対物レンズの二つの部分の間に、検出器に向く発光光路の伝播方向に、まず、ビーム分割板を、フレネル反射によって反射される光の部分（主に励起波長の光からなる）の直交反射に対して $45^{\circ}$ に配置したのち、ルミネセンス光の選択的伝送のために、中心波長 $679\text{nm}$ 及び帯域幅 $25\text{nm}$ の干渉フィルタ（Omega Optical、バーモント州Brattleborough）2個を配置した。ビーム分割板によって発光光路の外に反射される光の部分を、直接又は励起波長のための干渉フィルタに通して、横方向に解像又は解像しない検出器に向けた。センサプラットフォーム上の同じ区域から常に出る、計測区域からの参照信号及びルミネセンス信号を、上記例と同様、同時に記録した。

#### 【0130】

(ii) 計測区域からの順次信号記録のための検出系

イメージングするセンサプラットフォーム上の計測区域を、該計測区域を1:1の縮尺で開口にイメージングするレンズ系の焦点に配置した。この開口は、対象計測区域外の区域をマスキングすることができた。開口そのものを、同じく系の背後で検出器に向かう方向に平行な光路を生成するように配置された少なくとも

も2個のレンズを含む系の第一のレンズの焦点に配置した。光路の平行部分には、まず、平行な光路に対して $45^\circ$ で配置される光線分割板を配置した。この光線分割板は、収集した光の、主に励起波長の散乱光からなる部分を、場合によっては該反射光が励起波長の干渉フィルタを通過したのち、フレネル反射によって参照検出器、たとえば増幅器に接続されたフォトダイオードの方向に反射するために使用される。光線分割板の背後でさらに伝播する伝送されたルミネセンス光を、二つの干渉フィルタ (Omega Optical、679 DF025) によって選択し、選択された光電子増倍管を光子計数装置 (Hamamatsu H6240-02セレクト) と組み合わせたものである検出器に合焦させた。

#### 【0131】

異なる計測区域からの信号を順次に記録するため、例2. a) に記載した配置要素によってセンサプラットフォームをx及びy方向に並進させた。

#### 【0132】

同じく、一つの工程で励起し、検出することができる区域よりも大きなセンサプラットフォーム上の区域からの信号収集のため、多数の計測区域の同時励起及び横方向解像検出器による信号収集と、並進工程との組み合わせを実施することができる。

#### 【0133】

#### 例3

#### 分析系

以下に挙げるすべての例は、対応するサンプル区画を有するセンサプラットフォーム及び流体供給システムそれぞれを全体的又は部分的に温度調節することができるように設計されている。

#### 【0134】

#### (a) 一つの連続閉鎖フローセル+流体系

例1 a) のセンサプラットフォームを例2. a. iv) の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I) の検出モジュールを選択した。センサプラットフォームに向けて開口し、その上の全区域を、構造I及びIIを含め、幅8mmで取り囲むサンプル室を有する閉鎖サンプル区画を、閉鎖流系における種々の試薬及

びサンプルの順次適用に使用した。サンプル区画の材料は、有利には、蛍光を含まない、自己接着性で可撓性で流体シール性の低反射プラスチック、実例として、黒化ポリジメチルシロキサンからなるものであった。サンプル室の深さは0.1 mmであり、サンプル室の全容積として $25 \mu\text{l}$ を与えた。連続サンプル室は、一つの同じサンプル又は試薬をすべての計測区域に同時に塗布するために使用した。入口又は出口として交換可能に使用することができる2個の開口を、センサプラットフォームとは反対側で、サンプル区画の左右のエッジに配置した。シリンジポンプ (Cavro XL 3000、Cavro、米カリフォルニア州Sunnyvale) を使用して、シリンジのサイズに依存して $1 \mu\text{l}$ ~ $10 \mu\text{l}$ の用量精度で、サンプル及び試薬の供給を実施した。シリンジポンプは、市販のオートサンプラ (Gilson 231 XL) 、一つ以上のマルチポート弁及びサンプルループをさらに含む流体系の一部であった。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

#### 【0135】

(b) 5個の平行な閉鎖流路を有するフローセル+流体系

例1 a) のセンサプラットフォームを例2. a. ii) の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I) の検出モジュールを選択した。閉鎖流系における種々の試薬及びサンプルの順次適用のために、センサプラットフォームに向けて開口する、それぞれ幅1 mmで互いに1 mmの距離をおく平行な5個のサンプル室を有する閉鎖流セルを使用した。サンプル室は、格子構造I及びIIを超えて延びるものであった。サンプル室の深さは0.1 mmであり、各サンプル室の全容積として約 $2.5 \mu\text{l}$ を与えた。上から特定される計測区域に同種又は異なる試薬を塗布するために5個のサンプル室を使用した。入口又は出口として交換可能に使用することができる2個の開口を、センサプラットフォームとは反対側で、各サンプル区画の左右のエッジに配置した。約 $0.5 \mu\text{l}$ の用量精度を可能にするシリンジポンプ (Cavro XL 3000、Cavro、米カリフォルニア州Sunnyvale) を使用して、小さなサイズ ( $50 \mu\text{l}$ ~ $250 \mu\text{l}$ ) のシリンジで、サンプル及び試薬の供給を実施した。シリンジポンプは、市販のオートサンプラ (Gilson 231 XL) 、一つ以上のマルチポート弁及び一つ以上のサンプルループをさらに含む流

体系の一部である。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

#### 【0136】

c) 個別に指定可能な試薬適用のための開口サンプル容器

全センサプラットフォーム上で変調する単回折格子構造を有する例1 b) のセンサプラットフォームを例2. a. v) の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I) の検出モジュールを選択した。

#### 【0137】

個別に指定可能な開口サンプル区画へのサンプル及び試薬の付加又はそこからの取り出しを可能にするため、センサプラットフォームを水平に取り付けた。サンプル区画の構造は、厚さ1～3 mmの、自己接着性で流体シール性の黒化ポリジメチルシロキサンプレートから形成した。このプレートには、流体で個別に指定される計測区域又はいくつかの計測区域を合わせたセグメントに幾何学的に一致する多数の連続的に配置された開口（典型的な直径1 mm～3 mm）を挿入しておいた。高いコピー数で対応するマスクから形成することができる、このようにして構成されたPDMSプレート（前記例で記載したサンプル区画と同様）をセンサプラットフォーム表面と接触させると、開口を互いに対して流体シールすることにより、それに付着した。一つのディスペンサ又は並列にした多数のディスペンサにより、等しい又は異なるサンプル及び試薬をサンプル区画に充填するか、そこから取り出した。特に揮発性の高いサンプル又は試薬の場合に蒸発を避けるため、水蒸気の飽和雰囲気存在で流体適用工程を実施した。

#### 【0138】

ディスペンサは、市販のオートサンブラ（Gilson 231 XL）、一つ以上のマルチポート弁及びサンプルループをさらに含む流体体系の一部であった。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

#### 【0139】

d) さらにサンプル区画をもたないディスペンサによるサンプル及び試薬の適用

全センサプラットフォーム上で変調する単回折格子構造を有する例1 b) のセンサプラットフォームを例2. a. v) の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I) の検出モジュールを選択した。

#### 【0140】

個別に指定可能な開口サンプル区画へのサンプル及び試薬の付加又はそこからの取り出しを可能にするため、センサプラットフォームを水平に取り付けた。一つのディスペンサ又は並列にした多数のディスペンサにより、等しい又は異なるサンプル及び試薬を計測区域又はセグメントに個別に指定して塗布するか、一つのディスペンサ又は並列にした多数のディスペンサにより、そこから取り出した。特に揮発性の高いサンプル又は試薬の場合に蒸発を避けるため、水蒸気の飽和雰囲気の中で流体適用工程を実施した。

#### 【0141】

ディスペンサは、市販のオートサンプラ (Gilson 231 XL)、一つ以上のマルチポート弁及びサンプルループをさらに含む流体系の一部であった。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

#### 【0142】

例4

ルミネセンス検出法

4. a) 適用溶液

1) リン酸緩衝液  $3.26 \text{ ml}$  ( $0.070 \text{ M}$ 、 $\text{pH } 7$ )、 $\text{KCl } 29.5 \text{ g}$ 、 $\text{EDTA} \times 2 \text{ H}_2\text{O } 0.09 \text{ g}$ 、ポリ(アクリル酸) 5100ナトリウム塩  $2.25 \text{ g}$ 、Tween 20  $2.25 \text{ g}$ 、アジ化ナトリウム  $1.13 \text{ g}$ を蒸留水で4.5リットルまで充填し、1モル苛性ソーダ液で $\text{pH } 7.7$ に調節したものからなるハイブリダイゼーション緩衝液 ( $\text{pH } 7.7$ )

#### 【0143】

2) サンプル溶液 ( $16 * c - Cy - 5$ ) : 計測区域に固定化されたオリゴマーに対して相補的な16個の塩基対 (ハイブリダイゼーション緩衝液1中  $Cy5 - 5' - \text{GTTGTGTGGAA TTGTG} - 3'$  ( $10^{-9} \text{ M}$ )) からなる  $Cy5$

ー標識オリゴマー

【0144】

3) 再生溶液：脱イオン水250 mlに溶解した、塩化ナトリウム0.22 g、クエン酸ナトリウム0.11 g、Tween 20 2.5 g、ホルムアミド142 g及びアジ化ナトリウム0.13 g

【0145】

4. b) 計測法

(i) 例1 a) のセンサプラットフォームを、例2. a. v) の励起モジュール及び例2. b. i. I) の検出モジュールならびに例3. a) の閉鎖フローセルとともに使用した。

【0146】

計測法は、以下の個々の工程からなるものであった。

ハイブリダイゼーション緩衝液1) で5分間洗浄し(0.5 ml/min)、バックグラウンド信号を記録する。

サンプル溶液を5分間供給する(1 nM 16 \* c - Cy - 5 ; 0.5 ml/min)。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する。

再生溶液を5分間供給する(0.5 ml/min)。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する(再平衡化)。

【0147】

計測過程で、計測区域が上に位置するセンサプラットフォームのカメラ画像をルミネセンス波長で1分間隔で記録した。

【0148】

(ii) 例1 b) のセンサプラットフォームを、例2. a. v) の励起モジュールならびに例2. b. i. I) の検出モジュール及び例3. a) の閉フローセルとともに使用した。

【0149】

計測法は、以下の個々の工程からなるものであった。

ハイブリダイゼーション緩衝液1) で5分間洗浄し(0.5 ml/min)、バック

グラウンド信号を記録する。

サンプル溶液を5分間供給する (1 nM 16 \* c - C y - 5 ; 0.5 ml/min)

。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する。

再生溶液を5分間供給する工程 (0.5 ml/min) 。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する (再平衡化) 。

【0150】

計測過程で、計測区域が上に位置するセンサプラットフォームのカメラ画像をルミネセンス波長で1分間隔で記録した。

【0151】

4. c) 結果

以下、計測法4. b. i) にしたがって得られた結果を例として論じる。はじめに、拡大した励起光線ビームを内結合条件下で格子構造Iの中心に向け、長さ4 mm×幅9 mmの直接照射区域を生成した。6×6計測区域 (列×行) の一番下の行は、フローセルの境界の近くに位置し、したがって、他の計測区域と同じ条件下で分析対象物の供給が起こらなかったため、分析には考慮しなかった。ハイブリダイゼーション工程の後で、以下の平均正味ルミネセンス信号を、これらの計測区域からの絶対信号とバックグラウンド信号との差として測定した (表1、単位「秒あたり計数、cps」) 。

【0152】

【表1】



表 1:

列	1	2	3	4	5	6
行 1	14800	19350	21100	33000	34300	39000
行 2	15600	18410	21800	34900	38010	38300
行 3	14600	17700	19700	32600	32700	41400
行 4	14900	20700	19700	27200	36900	42100
行 5	13500	16300	19100	23700	31000	41300
平均	14680	18492	20280	30280	34582	40420
標準偏差 (%)	5.2	9.0	5.5	15.4	8.4	4.1

## 【0153】

例 1. a) で使用したセンサプラットフォームの場合、 $12 + \sqrt{-3}$  nm の格子深さで、励起光の内結合及び外結合の効率が不完全であり、誘導モードの方向で利用可能な励起光の強さにプラスの勾配を生じ、その結果、表 1 の列数の増大とともに観察されるルミネセンス信号が増大した。一例として、計測区域の行 5 の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンを図 1 にグラフとして示す。

## 【0154】

計測法 4. b. i のさらなる過程で、センサプラットフォームを、格子構造 I の右エッジの近くに内結合された励起光の一部が、光学的に透明な層 (a) の中を、それが外結合される格子構造 II の方向にさらに伝播することができるほど、角度を変えずにその長手側に対して平行に並進させた。励起光が格子構造 I 及び II の間の区域を通過すると、両格子構造の間に位置する、計測区域のセグメントの例としての計測区域の第二の  $6 \times 6$  アレイを励起した。アレイの上寄り二行は、サンプル区画の上境界に位置していた。これらの計測区域からの信号は分析に考慮しなかった。

## 【0155】

ハイブリダイゼーション工程の後で、以下の平均正味ルミネセンス信号を、これらの計測区域からの絶対信号とバックグラウンド信号との差として測定した (表 2、単位「秒あたり計数、cps」)。

【0156】

【表2】

表 2:

列	1	2	3	4	5	6
行 3	27174	18900	18230	17964	13080	11943
行 4	27900	19410	19025	17950	16130	14500
行 5	26033	21530	20667	17025	15217	13000
行 6	24274	22290	17949	16621	14265	11700
平均	26345	21076	18968	17390	14673	12786
標準偏差 (%)	6.0	5.8	6.4	3.9	8.9	10.0

【0157】

この例では、利用可能な誘導された励起光の強さのマイナス勾配に対応する、格子構造 I 及び II の間の光学的に透明な層 (a) 中の伝播損失は比較的高く、結果として、正味ルミネセンス信号は、誘導される励起光の伝播距離の増大又は計測区域の列数の増大とともに有意に減少した (表 2 を参照)。一例として、表 2 の計測区域の行 5 の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンを図 2 にグラフとして示す。

【0158】

この計測法のさらなる過程で、センサプラットフォームとその法線との間の角度を、光学的に透明な層 (a) の中を右に伝播する誘導励起光のモードに通じる  $-4^{\circ}$  から、上記図を参照しながら  $+4^{\circ}$  に変化させた。このようにして、左に伝播するモードの生成のための内結合条件を満たした。

【0159】

このように、内結合条件下で、格子構造 I の計測区域の  $6 \times 6$  アレイの四つの列を励起することができた。したがって、一例として図 3 の計測区域の行 5 の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンで見てとれるように、内及び外結合の不完全な効率のため、左に増大する利用可能な誘導励起光強さの勾配が確立された。

## 【0160】

(ii) 以下、計測法4. b. ii) の結果をさらなる例として論じる。拡大した励起光線を、内結合条件下、均一な格子構造を全センサプラットフォーム上で連続的に変調させたセンサプラットフォーム上に位置する計測区域のアレイに向けた。

## 【0161】

より大きな  $25 + \text{ } / - 5 \text{ nm}$  の格子深さのおかげで内結合及び外結合の効率ははるかに高く、利用可能な励起光の強さに、計測結果の統計的偏差をほとんど超えない影響を示す非常に小さなプラス勾配が誘導モードの方向に得られた。一例として、計測区域の行5の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンを図4にグラフとして示す。

## 【0162】

例5

a) センサプラットフォーム

(i) 幅  $16 \text{ mm}$  × 長さ  $48 \text{ mm}$  × 厚さ  $0.7 \text{ mm}$  の外寸のセンサプラットフォームを使用した。基材（光学的に透明な層（b））は、AF45ガラス（ $633 \text{ nm}$ での屈折率  $n = 1.52$ ）からなるものであった。反応性磁場増強DCスパッタリングにより、光学的に透明な層（b）上に光学的に透明な  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  層（a）を生成すると、 $633 \text{ nm}$ での  $2.15$  の屈折率を示した（層厚さ  $150 \text{ nm}$ ）。センサプラットフォームは、それぞれ周期  $360 \text{ nm}$  の二つの離れた格子構造を例1a)と同様な配置でさらに含むものであった（長さ  $5 \text{ mm}$  × 幅  $12 \text{ mm}$  及び長さ  $1 \text{ mm}$  × 幅  $12 \text{ mm}$  の寸法、格子深さ  $12 + \text{ } / - 3 \text{ nm}$ ）。しかし、以下に記載する計測法では、格子構造は、ルミネセンス励起又はルミネセンス検出のために特別には使用しなかった。

## 【0163】

(ii) 幅  $16 \text{ mm}$  × 長さ  $48 \text{ mm}$  × 厚さ  $0.7 \text{ mm}$  の外寸のセンサプラットフォームを使用した。物理パラメータは例1. b)と同様であった。基材（光学的に透明な層（b））は、AF45ガラス（ $633 \text{ nm}$ での屈折率  $n = 1.52$ ）からなるものであった。スピコートによって被着されたフォトレジストで覆われた導波層

(a) をホログラフィー露光したのち、湿式化学エッチングすることにより、周期  $360\text{ nm}$  及び格子深さ  $25 + / - 5\text{ nm}$  の表面レリーフ格子の連続構造を基材中に生成した。格子線の向きは、センサプラットフォームの所与の幅に対して平行になる。反応性磁場増強 DC スパッタリング (DE 44 10 25 8 を参照) により、光学的に透明な層 (b) 上に光学的に透明な  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  導波層 (a) を生成すると、 $633\text{ nm}$  での  $2.15$  の屈折率を示した (層厚さ  $150\text{ nm}$ )。内結合条件下、 $633\text{ nm}$  の励起光を約  $+3^\circ$  の角度で構造に結合した。約  $-6^\circ$  の角度で  $670\text{ nm}$  (Cy 5 の蛍光の最大値に対応) の波長の光の内結合又は外結合が起こった。

#### 【0164】

生化学的もしくは生物学的又は合成の認識要素の固定化の準備として、センサプラットフォーム 5. a) (i) 及び (ii) を清浄し、エポキシシランによって液相中でシラン化した (オルト-キシレン  $500\text{ ml}$  中  $10\text{ ml}$  ( $2\% \text{ v/v}$ ) 3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン及び  $1\text{ ml}$  ( $2\% \text{ v/v}$ ) N-エチルジイソプロピルアミン ( $70^\circ\text{C}$  で 7 時間))。蛍光標識された 18 マーオリゴヌクレオチド (Cy 5-5' -CCGTAACCTCATGATATT-3' -NH<sub>2</sub>,  $18 * \text{Cy 5-NH}_2$ ) の溶液を、市販のスポット (Genetic Microsystems 417 アレイヤ) で、それぞれ  $16 \times 8$  個のスポット ( $8 \text{ 行} \times 16 \text{ 列}$ 、スポットあたり  $50\text{ pl}$ ) からなる二つのアレイに被着した。塗布した溶液の濃度は、行ごと交互に、 $10^{-7}\text{ M}$  及び  $10^{-6}\text{ M}$   $18 * \text{Cy 5-NH}_2$  であり、その結果、それぞれ  $\mu\text{m}^2$  あたり  $100$  個及び  $10$  個の、被着スポット (直径約  $125\text{ }\mu\text{m}$ 、中心間距離  $375\text{ }\mu\text{m}$ ) 中のフルオロフォア濃度が得られた。

#### 【0165】

それぞれ幅約  $3.2\text{ mm}$   $\times$  長さ  $5.8\text{ mm}$  のスポットアレイをセンサプラットフォーム上に  $3.3\text{ mm}$  間隔の行にアレイして、センサプラットフォーム (i) の場合、両方のアレイが次の結合格子まで数ミリメートルの距離で位置するようにした。

#### 【0166】

b) 光学系

収束励起光束の直接照射の配置で励起光を投射することにより、センサプラットフォーム (i) 及び (ii) のスポットアレイからの蛍光強さを市販のスキナ (Genetic Microsystems 418 Array Scanner) で計測した。そのために、励起光束の光軸をセンサプラットフォームに対して垂直に向けた。励起光の強さは約 5 mW であった。レーザスキナの対物レンズの開口数は、約 53° の半開口角に対応した。走査速度は、製品カタログに記された値に準じていた (18 mm/min、走査幅 22 mm)。

#### 【0167】

さらなる比較のため、センサプラットフォーム (i) (格子構造 I 及び II を有する) 上の計測区域からの蛍光を、平行な励起光束を使用して、格子構造 I (長さ 1 mm × 幅 12 mm、内結合角 + 3°) の右エッジにおける内結合により、内結合条件下で計測した。そのために、例 2 の励起モジュール / 励起モジュール a. ii (ヘリウムネオンレーザからの励起光線、0.6 mW、円柱形レンズで拡大) を例 2. b) (i) (I) の検出モジュールと組み合わせて使用した。

#### 【0168】

##### c) 結果

計測結果の選択を表 3 にまとめる。それぞれ等しいフルオロフォア濃度 ( $\mu\text{m}^2$  あたりフルオロフォア 10 個) の 10 個の隣接スポットを含む四つの区画から、減衰励起、すなわち、センサプラットフォーム (i) の未構成部分に位置する計測区域に励起光を内結合する場合、二つのそのような区画からそれぞれセンサプラットフォーム (i) 及び (ii) に適用される直接照射の場合、信号 (全信号と局所バックグラウンド信号との差としての正味蛍光信号)、バックグラウンド信号及びノイズを測定した。

#### 【0169】

直接照射の構造では、全プラットフォーム上で変調する単回折格子上の計測区域を有するセンサプラットフォーム (ii) の場合に、計測区域の領域に格子構造をもたないセンサプラットフォーム (i) の場合よりも有意に高い蛍光信号が観察された。適用された実験条件の下では、光学的に透明な導波層 (a) への励起光の内結合を、センサプラットフォーム (i) の場合、厳しく排除することがで

き、センサプラットフォーム (ii) の場合、多大な程度に無視することができ、内結合が起こるような角度では、強く収束する励起光路に関して励起光の非常に小さな部分だけが格子構造に当たる。観察される蛍光強さの有意な増加は、非減衰的に励起される光学的に透明な層 (a) の近接場に位置するフルオロフォアからの蛍光の有意な部分に帰されるはずである (この層に結合される)。しかし、格子構造の深さに依存する非常に短い伝播長ののち、連続的に変調する格子構造によって再び外結合される。外結合がセンサプラットフォームの所与のパラメータのために約  $-6^\circ$  の角度で起こるとき、外結合された部分はまた、対物レンズの高い開口数のため、検出器によって収集される。観察されるルミネセンスの増大の小さな部分はさらに、内結合される励起光の小さな部分に帰することができる。高い外結合効率が、バックグラウンド信号の有意な差は観察されないという観察によって実証され、その結果、逆結合された蛍光の、隣接計測区域間のクロストークを本発明にしたがって効率的に防ぐことができる。

#### 【0170】

同じパラメータを有するセンサプラットフォーム (i) の場合、ルミネセンス光の同様な部分が層 (a) に内結合する。しかし、この場合、内結合された蛍光は、検出器の視野の外に位置する格子構造によってのみ外結合することができる、すなわちセンサプラットフォームの側方エッジから出ることができる。

#### 【0171】

10倍のフルオロフォア濃度を用いる計測は、両方のセンサプラットフォームに関して約10倍の高さの蛍光信号及び信号ノイズ比につながった。ノイズに対する正味信号の比は、相応に長い計測時間 (10倍走査の場合で1分～10分の例で)、この例では約3の係数により、さらに改善することができる。

#### 【0172】

内結合条件下でセンサプラットフォーム (i) を用いる比較計測は、本発明のこの構造により、はるかに弱い励起光によっても感度をさらに有意に、すなわち、これらの条件下、露光時間に依存して5～12倍に高めることができることを実証した。この方法に関して、さらには、例の条件から自明であるように、有意に短い計測時間しか要らない。

【0173】

【表3】

表 3:

	直接励起： スキャナ418		減衰励起，プラットフォーム(i)		
	プラットフォーム (i)	プラットフォーム (ii)	1 秒	3 秒	10 秒
正味信号	196 +/-34	905 +/-228	541 +/- 21	1511 +/- 83	4097 +/-263
バック グラウンド	253 +/-8	237 +/-6	86 +/-5	241 +/- 15	683 +/-47
ノイズ	144 +/-4	164 +/-2	19.8 +/-0.4	30.5 +/-2.7	62 +/- 12
信号/ ノイズ	1.4 +/-0.3	5.5 +/-1.3	27.3 +/-0.5	49.6 +/-1.6	67 +/- 8

【図面の簡単な説明】

【図1】

表1の計測区域の行5の全ルミネセンス信号を示すグラフである。

【図2】

表2の計測区域の行5の全ルミネセンス信号を示すグラフである。

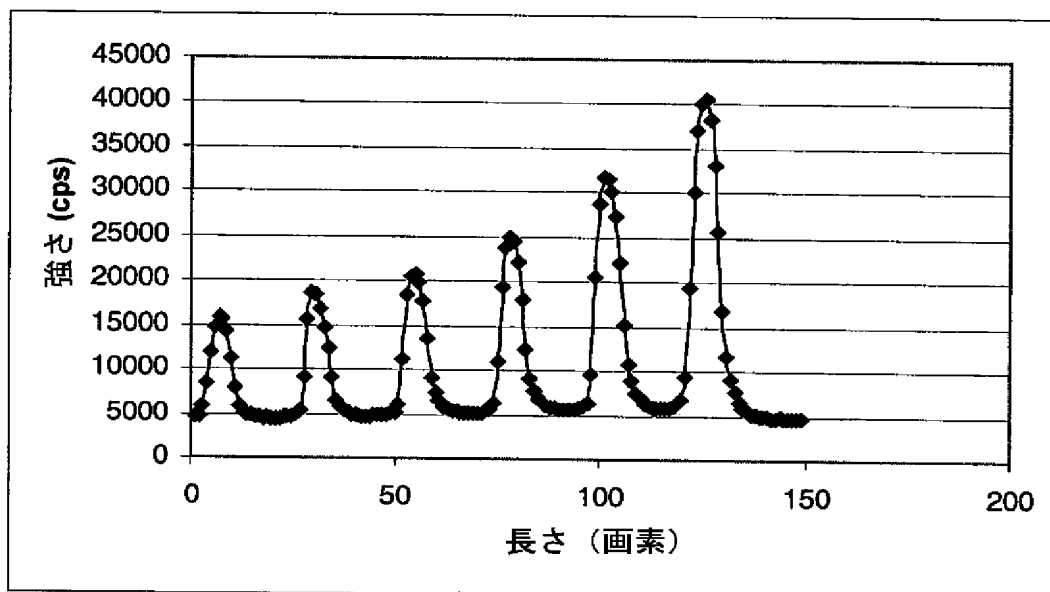
【図3】

内結合条件下での計測区域の行5の全ルミネセンス信号を示すグラフである。

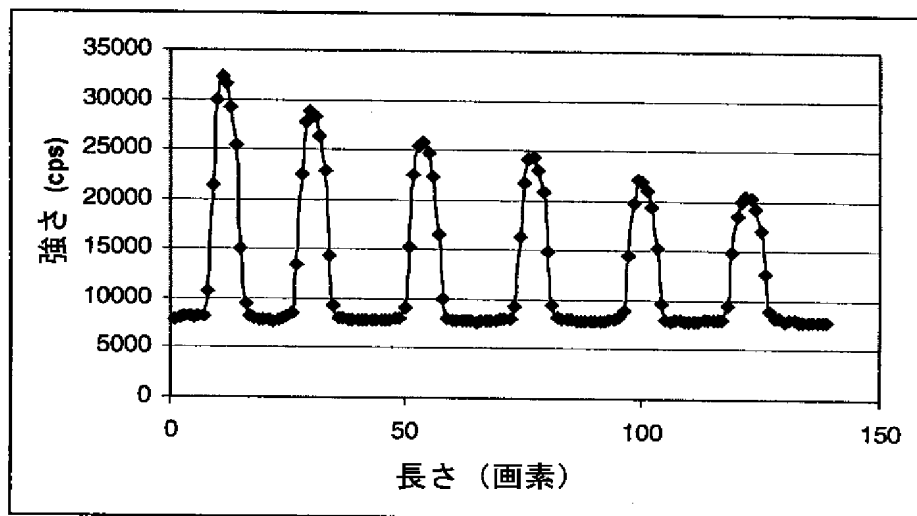
【図4】

計測法4. b. ii) による計測区域の行5の全ルミネセンス信号を示すグラフである。

【図 1】

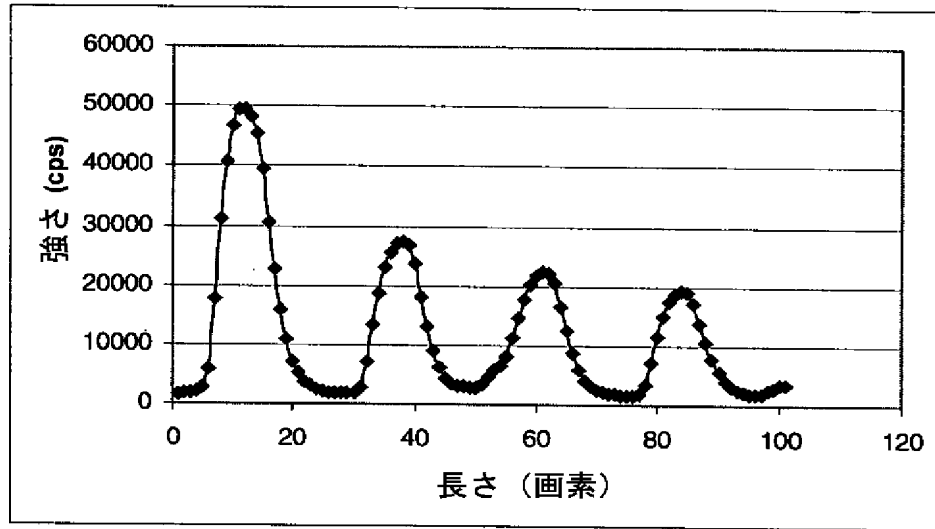


【図 2】

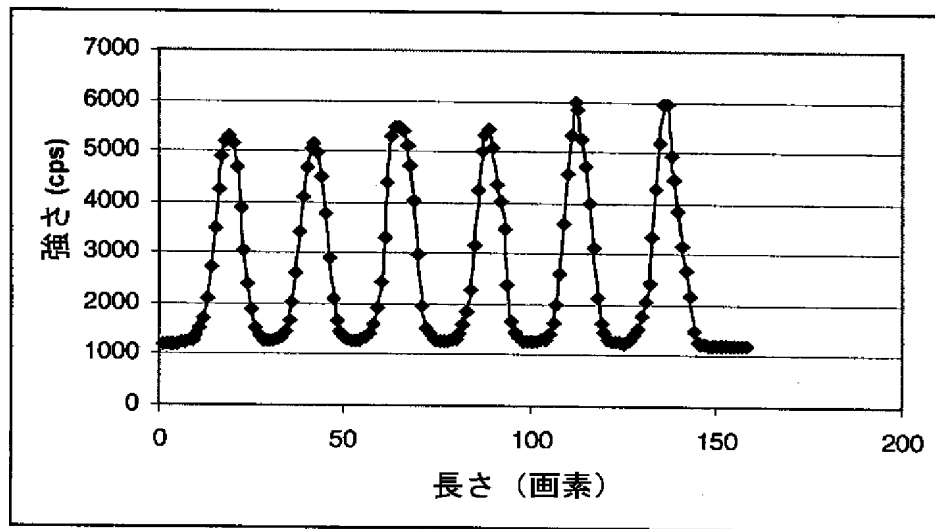




【図3】



【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成13年12月6日(2001.12.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域(d)又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント(d')からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層(a)よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層(b)と、該層(b)の上の第一の光学的に透明な層(a)とを有し、

励起光を計測区域(d)に内結合するための、少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント(d')の面積において連続的に変調する格子構造(c)を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域(d)又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント(d')を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素(e)を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層(a)に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造(c)によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプ

ラットフォーム。

【請求項2】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上のセグメント（d'）からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）と、該層（b）の上の第一の光学的に透明な層（a）とを有し、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域の面積において連続的に変調する格子構造（c）によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプラットフォーム。

【請求項3】 二つ以上の計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造が、異なる波長の励起光の内結合のために異なる周期数の二つ以上の格子構造を重ね合わせたものであり、格子線が互いに対して平行又は非平行、好ましくは非平行に向き、二つの重ね合わせた格子構造の場合、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直である、請求項1又は2記載のセンサプラットフォーム。

【請求項4】 層（a）よりも低い屈折率を有し、層（a）と接触しており、厚さ5 nm～10000 nm、好ましくは10 nm～1000 nmの別の光学的に透明な層（b'）が、光学的に透明な層（a）及び（b）の間に位置している、請求項1～3のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項5】 生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素の固定化のために、厚さ200 nm未満、好ましくは20 nm未満の付着促進層（f）が光学的に透明な層（a）上に被着され、付着促進層が、シラン、エポキシド及び「自己組織化官能化単層」からなる群の化合物を含む、請求項1～4のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項6】 横方向に分けられた計測区域（d）が、好ましくは、インクジェットスポッティング、機械的スポッティング、マイクロコンタクトプリント、計測区域と生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素との流体接触からなる方法の群の方法を使用して、平行又は交差マイクロチャネルに供給することにより、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルの印加により、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素をセンサプラットフォームに横方向に選択的に被着させることによって形成される、請求項1～5のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項7】 生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として、核酸（DNA、RNA、...）及び核酸類似体（PNA、...）、抗体、アプタマー、膜結合し、単離された受容体、それらの配位子、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成された空洞などが被着されるか、あるいは、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として、全細胞又は細胞断片が被着される、請求項6記載のセンサプラットフォーム。

【請求項8】 非特異的結合又は吸着を最小限にするため、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物、好ましくは、たとえばウシ血清アルブミン又はポリエチレングリコールからなる群の化合物が横方向に分けられた計測区域（d）の間に被着される、請求項6～7のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項9】 二つ以上の横方向に分けられた計測区域が一般にセンサプラットフォーム上でセグメントに組み合わせられ、異なるセグメントが、好ましくはさらに、隣接区域の間の流体シール及び／又は隣接セグメント間の光学クロストークのさらなる軽減に貢献する被着された境界によって互いに分けられる、請求項1～8のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項10】 100,000個までの計測区域が二次元配置で設けられ、一つの計測区域が $0.001\text{ mm}^2 \sim 6\text{ mm}^2$ の面積を有する、請求項1～9のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項11】 格子構造(c)が、均一な周期の回折格子又は多重回折格子である、請求項1～10のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項12】 格子構造(c)が、内結合された光の層(a)中での伝播方向に対して平行又は垂直に、横方向に変化する周期数を有する、請求項1～10のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項13】 第二の光学的に透明な層(b)の材料が、石英、ガラス又は、たとえばポリカーボネート、ポリイミドもしくはポリメチルメタクリレートからなる群の透明な熱可塑性プラスチックを含む、請求項1～12のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項14】 第一の光学的に透明な層(a)の屈折率が2よりも大きい、請求項1～13のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項15】 第一の光学的に透明な層(a)が、 $\text{TiO}_2$ 、 $\text{ZnO}$ 、 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 、 $\text{Ta}_2\text{O}_5$ 、 $\text{HfO}_2$ 又は $\text{ZrO}_2$ 、特に好ましくは $\text{TiO}_2$ 又は $\text{Ta}_2\text{O}_5$ を含む、請求項1～13のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項16】 第一の光学的に透明な層(a)の厚さが $40 \sim 300\text{ nm}$ 、好ましくは $70 \sim 160\text{ nm}$ である、請求項1～15のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項17】 格子(c)が、 $200\text{ nm} \sim 1000\text{ nm}$ の周期及び $3\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ 、好ましくは $10\text{ nm} \sim 30\text{ nm}$ の変調深さを有する、請求項1～16のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項18】 励起光及び／又は逆結合されたルミネセンス光の不完全な

内結合及び外結合により、一つの計測区域内又はいくつかの計測区域を横切る、誘導された励起光及び／又は発生したルミネセンス光の強さの、格子深さによって制御することができるプラス勾配が、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に生成される、請求項 1 又は請求項 4 ～ 16 のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項 19】 格子 (c) が、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に、横方向に異なる格子深さを有する、請求項 18 記載のセンサプラットフォーム。

【請求項 20】 一つの計測区域内又はいくつかの計測区域を横切る、誘導された励起光及び／又は発生したルミネセンス光の強さの、光学的に透明な層 (a) 中での伝播損失の程度によって制御することができるマイナス勾配が、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に生成される、請求項 1 ～ 17 のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項 21】 第一の光学的に透明な層 (a) の厚さに対する変調深さの比が0.2以下である、請求項 17 記載のセンサプラットフォーム。

【請求項 22】 格子構造 (c) が、矩形、三角形又は半円形のプロフィールをもつレリーフ格子又は本質的に平面的な光学的に透明な層 (a) において周期変調を有する位相もしくは体積格子である、請求項 1 ～ 21 のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項 23】 光学系における調節を簡単にするため及び／又はサンプル区画を分析系の一部として接続するための、光学的又は機械的に認識可能なマークが上に設けられている、請求項 1 ～ 22 のいずれか1項記載のセンサプラットフォーム。

【請求項 24】 少なくとも一つの励起光源と、  
請求項 1 ～ 23 のいずれか1項記載のセンサプラットフォームと、  
センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域 (d) から発する光を収集するための少なくとも一つの検出器と  
を含む、一つ以上のルミネセンスを測定するための光学系。

【請求項 25】 励起光が直接又は透過照射の配置で計測区域に投射される

、請求項 2 4 記載の光学系。

【請求項 2 6】 ルミネセンス光の検出が、格子構造 (c) 又は (c') によって外結合されるルミネセンス光が同じく検出器によって収集されるような方法で実施される、請求項 2 4 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の光学系。

【請求項 2 7】 少なくとも一つの光源から発される励起光がコヒーレントであり、光学的に透明な層 (a) への結合のための共振角で一つ以上の計測区域に投射される、請求項 2 4 記載の光学系。

【請求項 2 8】 少なくとも一つの光源からの励起光が、回折光学要素又は、光源が多数ある場合には、好ましくは Damann 格子である多数の回折光学要素又は好ましくはマイクロレンズアレイである屈折光学要素によって可能な限り均一な強さの複数の個々の光線に多重化され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、横方向に分けられた計測区域に投射される、請求項 2 4 ~ 2 7 のいずれか 1 項記載の光学系。

【請求項 2 9】 同様な又は異なる発光波長の二つ以上のコヒーレント光源が励起光源として使用される、請求項 2 4 ~ 2 8 のいずれか 1 項記載の光学系。

【請求項 3 0】 二つ以上のコヒーレント光源からの励起光が異なる方向から同時又は順次に、異なる周期数の格子構造を重ね合わせたものを含む格子構造 (c) に投射される、請求項 3 記載のセンサプラットフォームを含む請求項 2 9 記載の光学系。

【請求項 3 1】 たとえば CCD カメラ、CCD チップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャネルプレート及びマルチチャネル光電子増倍管からなる群の横方向分割検出器が信号検出に使用される、請求項 2 4 ~ 3 0 のいずれか 1 項記載の光学系。

【請求項 3 2】 伝送された光束を成形するためのレンズもしくはレンズ系、光束を偏向させ、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲ミラー、光束を偏向させ、場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の一部分をスペクトル選択的に偏向させるための二色性ミラー、伝送される光の強さを調整するためのニュートラル濃度フィルタ、光束の一部分をスペクトル選択的に伝送するための光学フィルタもしくはモノクロメータ、又は励起もしくは

ルミネセンス光の別々の偏光方向を選択するための偏光選択要素からなる群の光学部品が、一つ以上の励起光源と請求項1～23のいずれか1項記載のセンサプラットフォームとの間及び／又は該センサプラットフォームと一つ以上の検出器との間に位置する、請求項24～31のいずれか1項記載の光学系。

【請求項33】 励起光が1 fsec～10 minの間隔のパルスで投射され、計測区域からの発光が時間分解的に計測される、請求項24～32のいずれか1項記載の光学系。

【請求項34】 計測区域の他にも、参照のために、光源の位置での励起光又は拡大後の励起光又は個々のビームへの多重化後の励起光、一つ以上の横方向に分けられた計測区域の位置からの励起波長の散乱光及び格子構造(c)によって外結合された励起波長の光からなる群の光信号が計測される、請求項24～33のいずれか1項記載の光学系。

【請求項35】 発光の測定のための計測区域と参照信号の測定のための計測区域とが同一である、請求項34記載の光学系。

【請求項36】 励起光の投射及び一つ以上の計測区域からの発光の検出が一つ以上の計測区域で順次を実施される、請求項24～35のいずれか1項記載の光学系。

【請求項37】 順次の励起及び検出が、ミラー、偏向プリズム及び二色性ミラーからなる群の可動光学部品を使用して実施される、請求項36記載の光学系。

【請求項38】 順次の励起及び検出が、本質的に焦点及び角度を保存するスキャナを使用して実施される、請求項36記載の光学系。

【請求項39】 センサプラットフォームが、順次の励起及び検出の過程の間で動かされる、請求項36～38のいずれか1項記載の光学系。

【請求項40】 センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域上の少なくとも一つのサンプル中の一つ以上の分析対象物をルミネセンス検出によって測定するための、光学膜導波路を含む分析系であって、

請求項1～23のいずれか1項記載のセンサプラットフォームと、

請求項24～39のいずれか1項記載の光学系と、



一つ以上のサンプルをセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段とを含む分析系。

【請求項4 1】 該分析系が、一つ以上の計測区域又はセグメントに組み合わされた計測区域内に少なくとも存在し、センサプラットフォームに向けて開口した一つ以上のサンプル区画をさらに含み、サンプル区画が好ましくは $0.1\text{ nl} \sim 100\text{ }\mu\text{ l}$ の容積を有する、請求項4 0記載の分析系。

【請求項4 2】 サンプル区画が、光学的に透明な層（a）とは反対側にある、サンプルの供給又は吐き出しのための入口及び／又は出口開口を除き、閉じており、サンプル及び場合によってはさらなる試薬の供給又は吐き出しが系を通して閉鎖流で実施され、共通の入口及び出口開口を有するいくつかの計測区域又はセグメントへの液体供給の場合、これらの開口が好ましくは行ごと又は列ごとに指定される、請求項4 1記載の分析系。

【請求項4 3】 サンプル区画が、光学的に透明な層（a）とは反対側に、サンプル又は他の試薬の場所指定供給又は取り出しのための開口を有する、請求項4 1記載の分析系。

【請求項4 4】 一つ以上の分析対象物の測定のための検定の間に湿潤され、計測区域と接触させられる試薬のための区画が設けられている、請求項4 1～4 3のいずれか1項記載の分析系。

【請求項4 5】 プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを同時に測定するための、センサプラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域上の一つ以上のサンプル中の一つ以上の分析対象物のルミネセンス検出による同時測定の方法であって、

第一の光学的に透明な層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）と、該層（b）の上の第一の光学的に透明な層（a）とを有し、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する

格子構造 (c) を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域 (d) 又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント (d') を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素 (e) を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域 16 個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層 (a) に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークを、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造 (c) によってこのルミネセンス光を外結合することによって防ぐ方法。

【請求項 4 6】 計測区域の励起光を格子構造 (c) によって光学的に透明な層 (a) に結合する、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】 (1) 等方向に発されたルミネセンス若しくは (2) 光学的に透明な層 (a) に逆結合され、格子構造 (c) によって外結合されるルミネセンス又は両方の部分 (1) 及び (2) のルミネセンスを同時に計測する、請求項 4 5 ~ 4 6 のいずれか 1 項記載の一つ以上のルミネセンスを測定する方法。

【請求項 4 8】 一つの計測区域内及び／又はいくつかの計測区域にかけて、内結合される励起光の伝播方向に対して平行な誘導される励起光及び／又は励起ルミネセンス光の制御可能な勾配によって信号計測及び／又は分析対象物定量のダイナミックレンジを増大又は制限する、請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項記載のセンサプラットフォーム上のルミネセンス検出によって一つ以上の分析対象物を測定する方法。

【請求項 4 9】 ルミネセンスの発生のために、励起することができ、300 nm ~ 1100 nm の波長で発光するルミネセンス標識として発光染料又はナノ粒子を使用する、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5 0】 ルミネセンス標識を、分析対象物又は、競合検定では、分

析対象物類似体又は、多ステップ検定では、固定化された生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素の結合相手の一つ又は生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素に結合させる、請求項49記載の方法。

【請求項51】 第一のルミネセンス標識と同様又は異なる励起波長及び同様又は異なる発光波長の第二又はそれ以上のルミネセンス標識を使用する、請求項49～50のいずれか1項記載の方法。

【請求項52】 第二又はそれ以上のルミネセンス標識が、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起でき、他の波長で発光する、請求項51記載の方法。

【請求項53】 加えられる発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルとが重複しないか、部分的にしか重複しない、請求項51記載の方法。

【請求項54】 供与体として働く第一の発光染料から受容体として働く第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動を分析対象物の検出に使用する、請求項51記載の方法。

【請求項55】 一つ以上のルミネセンスの測定の外に、計測区域における有効屈折率の変化を測定する、請求項45～54のいずれか1項記載の方法。

【請求項56】 一つ以上のルミネセンス及び／又は励起波長での光信号の測定を偏光選択的に実施し、好ましくは、励起光の偏光とは異なる偏光で一つ以上のルミネセンスを計測する、請求項45～55のいずれか1項記載の方法。

【請求項57】 抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジニング成分」、オリゴヌクレオチド、DNAもしくはRNAストランド、DNAもしくはRNA類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害剤、レクチン及び炭水化物からなる群の一つ以上の分析対象物を同時又は順次に定量的又は定性的に測定するための、請求項45～56のいずれか1項記載の方法。

【請求項58】 試験するサンプルが、天然の体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄又は光学的に濁った液体又は表面水又は土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであるか、生物学的組織から採取される、請求項45～57のいずれか1項記載の方法。

【請求項59】 薬学研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床

前開発における化学的、生化学的又は生物学的分析対象物のスクリーニング法での測定、親和性スクリーニング及び研究におけるリアルタイム結合研究及び運動パラメータの測定、定性的及び定量的な分析対象物測定、特にDNA及びRNA分析、医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における毒性発生研究及び発現プロファイルの決定及び抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、医薬品開発、患者の層別化、治療薬の選択、食品及び環境分析における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの測定のための、請求項45～58のいずれか1項記載の方法の使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域からの一つ以上のルミネセンスを測定するための、第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にある状態の、異なる層からなる光学膜導波路（「層化導波路」）と、励起光を計測区域に内結合（インカップル）するための少なくとも一つの格子構造とを含む、平面薄膜導波路に基づくセンサプラットフォームの可変的な実施態様に関する。本発明はまた、励起光源と、本発明のセンサプラットフォームの実施態様と、センサプラットフォーム上の計測区域から出る光を収集するための少なくとも一つの検出器とを含む、ルミネセンス測定のための光学系ならびに本発明のセンサプラットフォームと、本発明の光学系と、一つ以上のサンプルをセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段とを含む分析系に関する。本発明のさらなる主題は、本発明のセンサプラットフォーム、光学系及び分析系に基づくルミネセンス検出による測定方法ならびに定量的親和性感知及びさらなる異なる用途のためのこれらの方法の使用である。

## 【0002】

本発明の目的は、センサプラットフォームならびに一つ以上の分析対象物の高感度測定のための光学及び分析計測構造を提供することである。

## 【0003】

光波が、より低い屈折率の媒体によって取り囲まれた平面薄膜導波路に結合されると、その光波は、導波層の界面における全反射によって誘導される。最も簡単な場合、平面薄膜導波路は、三層系、すなわち支持材（基材）、導波層、スーパーストレート（及び分析されるサンプル）からなり、導波層が最も高い屈折率を有する。さらなる中間層が、平面導波路の動作をさらに改善することができる。

## 【0004】

この構造では、電磁エネルギーの一部がより低い屈折率の媒体に浸透する。この部分が減衰フィールドと呼ばれる。減衰フィールド（エバネッセント）の強さは、導波層そのものの厚さ及び導波層の屈折率とそれを取り囲む媒体の屈折率との比に非常に大きく依存する。薄い導波路、すなわち、誘導される光の波長と同じ又はそれよりも小さい層厚さの場合、誘導される光の離散的なモードを区別することができる。

## 【0005】

励起光を平面導波路に内結合する方法はいくつか公知である。最も初期に使用された方法は、エアギャップによる反射を減らすため、一般には液体がプリズムと導波路との間に導入される、前面結合又はプリズム結合に基づくものであった。これら二つの方法は、主に、比較的大きな層厚さの導波路、すなわち、特に自立的導波路及び2よりも有意に小さい屈折率の導波路に関して適している。しかし、励起光を高い屈折率の非常に薄い導波層に内結合するためには、結合格子の使用がはるかに洗練された方法である。

## 【0006】

光学膜（層化）導波路中を誘導される光波の減衰フィールドにおける分析対象物測定の種々の方法は、区別することができる。たとえば、適用される計測原理に基づく、一つには蛍光、すなわちより一般的なルミネセンス法と、他には屈折法とに区別することができる。これに関して、表面プラズモン共振の発生のた

めに投射される励起光の共振角が計測される量として取られるならば、より低い屈折率の誘電層の上の薄い金属層中に表面プラズモン共振を発生させる方法を屈折法の群に含めることができる。表面プラズモン共振はまた、ルミネセンス計測において、ルミネセンスの増幅又は信号バックグラウンド比の改善に使用することもできる。表面プラズモン共振の発生ならびにルミネセンス計測及び導波構造との組み合わせの条件は、文献、たとえば米国特許US5,478,755、US5,841,143、US5,006,716及びUS4,649,280に記載されている。

#### 【0007】

本明細書では、「ルミネセンス」とは、光学的又は光学的以外の励起（たとえば電氣的又は化学的又は生化学的又は熱的励起）ののちに起こる、紫外線から赤外線までの範囲における光子の自発的放出をいう。

#### 【0008】

たとえば、ケミルミネセンス、バイオルミネセンス、エレクトロルミネセンス、特に蛍光及びりん光が「ルミネセンス」に含まれる。

#### 【0009】

屈折計測法の場合、導波路への分子吸着又は導波路からの分子脱着から生じる有効屈折率の変化を分析対象物検出に使用する。この有効屈折率の変化は、格子カプラセンサの場合、光の、格子カプラセンサへの内結合又は格子カプラセンサからの外結合（アウトカップル）のための結合角の変化から測定され、干渉計センサの場合、感知ブランチ中で誘導される計測光と干渉計の参照ブランチとの位相差の変化から測定される。

#### 【0010】

誘導される光波を内結合及び／又は外結合する（一つ以上の結合格子によって）ために一つ以上の結合格子を使用する現在の技術水準が、たとえば、K. Tiefenthaler、W. Lukoszの「Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors」、J. Opt. Soc. Am. B6, 209 (1989)、W. Lukosz、Ph. M. Nellen、Ch. Stamm、P. Weissの「Output Grating Couplers on Planar Waveguides as Integrated, Optical Chemical Sen

sors」、Sensors and Actuators B1, 585 (1990)及びT. Tamir, S. T.

Pengの「Analysis and Design of Grating Couplers」、Appl. Phys. 14, 235-254 (1977)に記載されている。

#### 【0011】

前記屈折法は、さらなるマーカ分子、いわゆる分子標識を使用せずに適用することができるという利点がある。しかし、これらの標識なし法の欠点は、より低い計測原理の選択性のせいで、達成可能な検出限界が、分析対象物の分子量に依存してピコ～ナノモル濃度範囲に限られ、それが、現代の微量分析の多くの用途、たとえば診断用途には十分ではないことである。

#### 【0012】

より低い検出限界を達成するためには、より高い信号生成の選択性のため、ルミネセンスベースの方法がより適当であると思われる。この構造では、ルミネセンス励起は、より低い屈折率の媒体への減衰フィールドの浸透深さ、すなわち、媒体への浸透深さが何百ナノメートル程度であるとき、導波区域に近接する区域に限られる。この原理は減衰ルミネセンス励起と呼ばれている。

#### 【0013】

分析論として、励起が導波層のすぐ近隣に限定され、バルク媒体の深さからの混乱効果を最小限にすることができるため、減衰ルミネセンス励起が非常に重要である。

#### 【0014】

減衰励起の条件下で平面光学導波路を使用してバイオセンサのルミネセンスを測定するための光度計器が同様に公知であり、たとえばWO90/06503に記載されている。同明細書で使用されている導波層は厚さ160 nm～1000 nmであり、励起波は格子カプラなしで結合される。

#### 【0015】

減衰的に励起されるルミネセンスの感度を高め、集積光センサを製造する種々の試みが成されている。たとえば、Biosensors & Bioelectronics 6 (1991), 595-607の報告書が、プリズムを使用して励起波を内結合する、2工程イオン交換法で製造される平面単一モード又は低モード導波路を記載している。使用さ

れる親和性系は、ヒト免疫グロブリンG／フルオレセイン標識タンパク質Aであり、抗体が導波路上に固定化され、検出されるフルオレセイン標識タンパク質Aがリン酸緩衝液中でポリビニルアルコール膜に加えられ、この膜で導波路の計測領域が覆われる。

#### 【0016】

この方法の大きな欠点は、導波層と基材層との間で小さな屈折率差しか達成することができず、その結果、感度が比較的低いということである。

#### 【0017】

感度は、フルオレセイン標識タンパク質Aの20nmとして得られる。これは、非常に小さな痕跡の測定にはまだ不十分であり、したがって、感度のさらなる増大が求められる。加えて、プリズムを使用する光の内結合は再現しにくく、内結合効率がプリズムと導波路との接触面の質及びサイズに大きく依存するため、実施しにくい。

#### 【0018】

米国特許第5,081,012号では、異なる原理が発案されている。平面導波層は、厚さ200nm~1000nmであり、二つ格子を含み、そのうち一方が反射格子の形態であり、その結果、内結合された光波は、格子と格子との間でセンサ領域を少なくとも二回通過しなければならない。これは、感度を増大させると考えられる。欠点は、反射した放射線がバックグラウンド放射線強さの望ましくない増大を招くかもしれないことである。

#### 【0019】

WO91/10122は、内結合格子と、物理的に離れた外結合格子とを含む薄層分光センサを記載している。高屈折率の無機金属酸化物を導波層として使用するならば、これは、吸収計測に特に適している。マルチクロマチック光源の内結合及び外結合に適した種々の実施態様が記載されている。導波層の好ましい厚さは200nmを超え、格子深さは約100nmであるべきである。これらの条件は、低い感度しか得られないため、親和性感知におけるルミネセンス計測には適さない。これは、Appl. Optics Vol. 29, No. 31 (1990), 4583-4589で、これらの系の全体効率のデータ(633nmで0.3%及び514nmで0.01%



）によって確認されている。

#### 【0020】

同じセンサのもう一つの実施態様では、ガス混合物分析装置として使用することができる複数のポリマー平面導波路層が基材に被着される。この場合、たとえば溶媒蒸気と接触したときのポリマー導波路の有効屈折率の変化又は層厚さの変化を利用する。そのため、導波構造は物理的に変更されている。しかし、このような変化は、内結合が変化して散乱の発生を増し、感度の有意な低下が起こりうるため、親和性感知におけるルミネセンス計測には全く不適當である。

#### 【0021】

ルミネセンス増幅が、導波路の表面又はその近く（すなわち、何百ナノメートルまでの距離で）で発光分子が励起したとき、励起光の直接的な内結合なしで、ただし、近接場効果によって媒介されて起こると考えられる他の構造が公知である。たとえば、米国特許第4,649,280号には、基材上の導電性かつ反射性の材料（たとえば銀）と、誘電性光学導波路（たとえば屈折率わずか1.39のフッ化リチウム）と、その上に被着された、蛍光を発することができる分子の膜との多層系が記載されている。さらなる発展で、米国特許第5,006,716号では、導電膜を表面レリーフ格子の形態に製造することがさらに提案されている。この形態は、最終構造の製造の付着処理の過程で表面に達するまで再現される。この構造の利点として、導波層に結合されたルミネセンス光を、格子により、外結合された回折オーダ及び導波路中で誘導されるモードに対応する離散的な空間方向に外結合することができ、それにより、検出器を外結合されたルミネセンス光の方向に配置したならば、より大きなルミネセンスの部分を検出器によって収集することが可能になることが記載されている。しかし、比較的低い屈折率の導波層をもつこれらの構造の不可欠な部分は、その下に位置する反射金属層の存在である。

#### 【0022】

しかし、再現可能な製造の場合、薄膜導波路のような、より簡単な二層系がより適當であると思われる。また、減衰フィールドの強さを増すために、できるだけ高い屈折率の導波膜を使用することが非常に望ましい。

## 【0023】

近年、透明な支持材料上のわずか何百ナノメートルの薄い導波膜に基づく屈折率の高い薄膜導波路により、感度を大幅に高めることができた。たとえばWO 95/33197には、回折光学要素としてのレリーフ格子によって励起光を導波膜に結合する方法が記載されている。センサプラットフォームの表面を、分析対象物を含有するサンプルと接触させ、減衰フィールドの浸透深さ内に位置する、発光することができる物質から等方的に発されるルミネセンスを適切な計測構造、たとえばフォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラによって計測する。また、減衰的に励起された放射線のうち、導波路に逆結合した部分を、光子のような回折光学要素によって外結合し、計測することができる。この方法は、たとえば、WO 95/33198に記載されている。

## 【0024】

現在の技術水準として特に明細書WO 95/33197及びWO 95/33198に記載されている、減衰的に励起されるルミネセンスを検出する方法すべての欠点は、センサプラットフォームの、均質な膜として形成された導波層上で常に一つのサンプルしか分析することができないことである。同じセンサプラットフォーム上でさらなる計測を実施するためには、退屈な洗浄又は清浄工程が絶えず求められる。これは、最初の計測の分析対象物とは異なる分析対象物を測定しなければならない場合、特に当てはまる。免疫検定の場合、これは一般に、センサプラットフォームの固定化層をまるごと交換しなければならないか、全く新たなセンサプラットフォームを使用しなければならないことを意味する。

## 【0025】

したがって、多数のサンプルを並列に、すなわち同時に又はさらなる清浄工程なしで続けざまに分析することを可能にする方法を開発する必要性がある。

## 【0026】

たとえば、WO 95/03538では、連続導波層上に、導波層の上のベースプレートの凹みとして形成された多数のサンプルセルを設けることが提案されている。各サンプルセルの下には、導波層中で誘導される光の一部を外結合する格子が位置している。分析対象物の測定は、分析対象物濃度の関数としての外結合

角の変化に基づく。一般に、屈折率の変化に基づくこの方法は、ルミネセンス法よりも大幅に感度が低い。

#### 【0027】

WO94/27137は、たとえば、減衰的に励起される蛍光を使用して免疫検定を実施するための装置及び方法を発案している。装置は、2枚の面平行面と、レンズとともに内結合要素として働く側方縁とを有する連続光学導波路からなる。複数の特異的結合相手が少なくとも一つの面上に固定化されている。好ましい実施態様では、これらの特異的結合相手は、連続導波路上に、互いに物理的に離間するようにアレイされている。実施例では、導波路の表面上にドットの形態で分散している。

#### 【0028】

開示された実施態様に基づく、側方縁を介して内結合することによって達成される効率は、格子を介して内結合する場合の効率よりも低いと推定されなければならない。さらには、大きな層厚さ（自立型導波路）のせいで、減衰フィールドの強さ、ひいては励起効率は、比較的小さな層厚さの単モード導波路の場合よりも大幅に低い。結果として、総じて構造の感度が制限される。

#### 【0029】

種々の特異的結合相手が連続導波層に被着されるこれらの構造はまた、励起光がフルオロフォア標識分子すべてを励起するという欠点を抱えている。したがって、場所に応じた計測場所の選択は可能ではない。加えて、減衰的に逆結合された蛍光光子は、隣接ドットからの信号に影響し、ひいては計測誤差を招くおそれがある。

#### 【0030】

遠隔通信に応用するための集積光学系では、チャネルの形態の導波路を含む平面光学部品が公知である。導波チャネルは、マスクを援用する表面での個々のイオンの交換によって製造される (Glastechnische Berichte Vol. 62, page 285, 1989)。イオンでドーピングされたチャネルの中で屈折率のわずかな増加を示す物理的に相互接続された層が得られる。増加は一般に5%未満である。そのような部品は複雑であり、製造に費用がかかる。

## 【0031】

SPIE Vol. 1587 Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors III (1991), page 98-113では、R. E. Kunzは、分岐したのち再び合流し、集積光学機器、たとえば干渉計に特に適した光学導波路を記載している。このような構造は、要素を個々に特定することができず、複数のフォークの連続配置が、第一のフォークで内結合される光波の大きな強さ損失を急速に招くため、減衰的に励起されるルミネセンス計測には適さない。このようなフォークの開き角は小さい（通常は $3^\circ$ ）ため、小型部品の場合のフォークの2本のブランチ間の距離は短いか、そうでなければ、部品の寸法を相応に大きくしなければならず、これは一般に望ましくない。加えて、分岐した波と波との固定相関係はルミネセンス計測に不要である。

## 【0032】

WO99/13320では、少なくとも二つの異なる光部分を検出するための光学センサが特許請求されている。この明細書は主に屈折計測法に関し、計測信号を生成するための蛍光及びりん光法がさらに特許請求されている。同じく多数の分析対象物の測定に関する明細書WO99/13320では、同じく特許請求されるセンサの同じ物理領域上の多数の「感知パッド」の生成のいくつかの異なる定義（WO99/13320における命名法に準ずる格子導波路構造）が与えられている。しかし、われわれの明細書における以下の定義に準じる多数の計測区域を、われわれの明細書におけるもう一つの以下の定義に準じる連続変調格子構造上に配置するという示唆はない。さらには、センサプラットフォーム上の計測区域が高密度である場合、特に導波層に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域からの計測光の間の混乱させるクロストークを防ぐ方法が示唆されていない。

## 【0033】

最大数の異なる計測区域を共通のプラットフォーム上に設けるためにセンサプラットフォームの可能な限りの小型化を達成するためには、この問題の解決が最大に重要である。

## 【0034】

たとえば、明細書WO 96/35940には、本質的に単モードの平面無機導波路を用いて同時又は順次にルミネセンスベースの多重計測を独占的に実施するため、励起光が別々に投射される少なくとも二つの離散的な導波区域が一つのセンサプラットフォーム上に設けられている配置（アレイ）が考案されている。しかし、センサプラットフォームを離散的な導波区域に分割することから生じる欠点は、共通のセンサプラットフォーム上の離散的導波領域における離散的な計測区域のための比較的大きな空間の必要性であり、この理由のため、ここでもまた、比較的低密度の異なる計測区域（いわゆる「フィーチャ」）しか達成することができない。

#### 【0035】

したがって、フィーチャ密度を増す又は計測区域あたりの所要空間を減らす必要性がある。

#### 【0036】

簡単なガラス又は顕微鏡スライドに基づき、さらなる導波層をもたない、非常に高いフィーチャ密度のアレイが公知である。たとえば、米国特許第5,445,934号 (Affymax Technologies) では、1平方センチメートルでフィーチャ1000個を超える密度のオリゴヌクレオチドのアレイが記載され、特許請求されている。このようなアレイの励起及び読み出しは、従来の光学構造及び方法に基づく。拡大した励起光束を使用するとアレイ全体に照射することができるが、これは、比較的低い感度を示す。散乱光の部分が比較的大きく、また、ガラス基板からの散乱光又はバックグラウンド蛍光は、分析対象物の結合のためのオリゴヌクレオチドが固定化されていない領域で生成される。励起及び検出を固定化されたフィーチャの領域に限定し、隣接領域における光生成を抑制するため、共焦点計測構造が広く使用され、異なるフィーチャが走査によって順次に分析される。しかし、その結果、大きなアレイの読み出しに要する時間が増し、光学装置が比較的複雑になる。

#### 【0037】

したがって、センサプラットフォームの具現化及び薄膜導波路に基づくセンサプラットフォームを用いて達成されてきた同じ高さの感度を達成することができ

る光学構造及びフィーチャあたりの所要計測面積を同時に最小限にする必要性がある。

#### 【0038】

驚くことに今、導波層（a）を有するセンサプラットフォーム上の計測区域に隣接する格子構造（c'）に関して特に格子深さの正しいパラメータが選択されるならば、センサプラットフォームの、格子構造（c）によって励起光が内結合（インカップル）された導波層（a）の中に逆結合（バックカップル）されるルミネセンス光を、短い距離の範囲で、すなわち、何百マイクロメートル内で完全に外結合（アウトカップル）することでき、ひいては、このルミネセンス光の導波層（a）中のさらなる伝播を防ぐことができることがわかった。

#### 【0039】

本発明の本質では、空間的に分けられた計測区域（d）が、液体サンプル中の一つ又は多数の分析対象物の認識のための、その上に固定化された生物学的もしくは生化学的区域又は合成の認識要素によって占有される区域によって画定される。これらの区域は、いかなる形状、たとえば点、円、矩形、三角形、楕円又は線の形を有することもできる。隣接計測区域で発生し、層（a）に結合されるルミネセンス光の混乱させるクロストークを防ぐのならば、異なる計測区域を格子構造（c）及び（c'）によって互いに分けることができる。異なる計測区域はまた、共通の連続格子構造上に配置することもできる。これは、結果として、格子の結合効率に依存して、ルミネセンスの混乱させるクロストークの部分的又は完全な防止を提供する。

#### 【0040】

光学的に透明な導波層に逆結合されるルミネセンス光がこの層の中を等方的に伝播する状態で、一つの同じ格子構造を使用して、励起光を導波層に内結合し、逆結合されたルミネセンス光をこの層から外結合することが可能である。したがって、格子構造（c）又は（c'）は、いずれも内結合格子及び外結合格子として使用することができる。

#### 【0041】

すでに内結合の位置にある適切な格子構造（c）によって励起光及び逆結合さ

れたルミネセンス光の両方を外結合することができるため（内結合及び外結合の効率は本質的に格子深さの適切な選択によって決まる）、共通の格子構造上で計測区域の非常に高い密度を達成することができる。達成可能な密度は、本質的に、生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素の固定化によって達成することができる最小スポットサイズによって決まる。センサプラットフォームは、横方向長さ数センチの面積を有することができる。したがって、二次元構造では、一つのセンサプラットフォーム上に100,000個までの計測区域を設けることができる。一つの計測区域は、0.001～6 mm<sup>2</sup>の面積を有することができる。

#### 【0042】

したがって、本発明のもう一つの主題は、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にあり、

励起光を計測区域（d）に内結合するための、少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造（c

）によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプラットフォームである。

#### 【0043】

本発明のセンサプラットフォームのこの実施態様はさらに、内結合角が満たされる、すなわちほとんど消失すると、励起光がセンサプラットフォームの背面から発される、すなわち光学的に透明な層（b）に入り、格子構造に向けられるとき、光学系におけるルミネセンス励起に影響しない励起光の最小化を生じさせるという利点を特徴とする。透過光の消失及び異常な「反射」の同時出現の物理的条件は、D. Rosenblattらの「Resonant Grating Waveguide Structures」IEEE Journal of Quantum Electronics, vol. 33 (1997) 2038-2059に例示され、記載され、説明されている。

#### 【0044】

感度に対する要求が緩和される用途の場合、励起光が内結合条件で投射されず、計測区域に対する直接又は透過光照射の簡単な構造にあるならば、それは有利であることができる。同じくこの構造では、光学（層別）導波路）の近フィールドでルミネセンスが増強され、再び、格子構造によって信号を外結合することにより、隣接する計測区域からの信号の光学クロストークなしで高いフィーチャ密度を達成することができる。

#### 【0045】

したがって、本発明の主題はまた、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上のセグメント（d'）からの一つ以上のルミネセンスの同時測定のためのセンサプラットフォームであって、

第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にあり、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測



区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークが、該計測区域の面積において連続的に変調する格子構造（c）によってこのルミネセンス光が外結合されることによって防止されるセンサプラットフォームである。

#### 【0046】

多くの用途の場合、特に生物学の分野で、対照物質を使用する参照又は校正のため、異なる励起波長の励起ならびに異なる励起波長及び同様なもしくは異なる発光波長のルミノフォア又は同様な励起波長の励起光ならびに異なる発光波長のルミノフォアを使用することが望まれる。

#### 【0047】

その場合、二つ以上の計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造が、異なる波長の励起光の内結合のための異なる周期数の二つ以上の格子構造を重ね合わせたものであり、格子ラインが互いに対して平行又は非平行、好ましくは非平行に向き、二つの重ね合わせた格子構造の場合、それらの格子線が好ましくは互いに対して垂直であるならば、それは有利である。

#### 【0048】

光学導波層（a）中で誘導されるモードの伝播損失の量は、下にある支持層の表面粗さ及びこの支持層に含まれるかもしれないクロモフォアの吸収によって多大な程度まで決まる。これはさらに、層（a）中で誘導されるモードの減衰フィールドの浸透（この支持層への）により、この支持層における不要なルミネセンスの励起の危険を伴う。さらには、光学的に透明な層（a）及び（b）の熱膨張

率の違いによって熱的応力が発生することがある。たとえば透明な熱可塑性プラスチックからなる化学的に高感度で光学的に透明な層（b）の場合、層（b）を攻撃するかもしれない溶媒の、光学的に透明な層（a）の微孔への浸透を防ぐことが望ましい。

#### 【0049】

したがって、層（a）よりも低い屈折率を有し、層（a）と接触しており、厚さ5 nm～10000 nm、好ましくは10 nm～1000 nmのさらなる光学的に透明な層（b'）が光学的に透明な層（a）と（b）との間に位置しているならば、それは有利である。中間層の目的は、層（a）の下表面粗さの軽減又は層（a）中で誘導される光の減衰フィールドの、下に位置する一つ以上の層への浸透の軽減又は下に位置する一つ以上の層への層（a）の付着の改善又は光学センサプラットフォーム内で熱的に誘発される応力の軽減又は層（a）の微孔を下に位置する層に対してシールすることによる、下に位置する層からの光学的に透明な層（a）の化学的分離である。

#### 【0050】

生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素を光学的に透明な層（a）に被着させる方法は数多くある。たとえば、被着は、物理的吸着又は静電氣的相互作用によって実施することができる。一般に、その場合の認識要素の向きは静的性質である。さらには、分析対象物を含有するサンプル及び分析過程で加えられる試薬が異なる組成を有するならば、固定化された認識要素の一部が洗い落とされる危険がある。したがって、生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素の固定化のために、付着促進層（f）が光学的に透明な層（a）に被着されるならば、それは有利であることができる。この付着促進層はもまた、透明であるべきである。特に、付着促進層の厚さは、導波層（a）を出てその上に位置する媒体に入る減衰フィールドの浸透深さを超えるべきではない。したがって、付着促進層（a）は、200 nm未満、好ましくは20 nm未満の厚さを有するべきである。付着促進層は、たとえば、シラン、エポキシド及び「自己組織化官能化単層」からなる群の化合物を含むことができる。

#### 【0051】

計測区域の定義で述べたように、横方向に分けられた計測区域（d）は、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素をセンサプラットフォーム上に横方向に選択的に被着させることによって生成することができる。発光することができる分析対象物又は固定化された認識要素との結合を求めて分析対象物と競合する発光で印された分析対象物類似体又は多工程検定における発光で印された結合相手と接触させられると、発光することができるこれらの分子は、固定化された認識要素によって占有された区域によって画定される計測区域だけで選択的にセンサプラットフォームの表面に結合する。

#### 【0052】

生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素を被着させるためには、平行又は交差マイクロチャネルに供給することにより、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルの印加により、インクジェットスポッティング、機械的スポッティング、マイクロコンタクトプリント、計測区域と生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素との流体接触からなる方法の群の一つ以上の方法を適用することができる。

#### 【0053】

核酸（DNA、RNA、...）及び核酸類似体（PNA、...）、抗体、アプタマー、膜結合し、単離された受容体、それらのリガンド、抗体に対する抗原、「ヒスチジンタグ成分」、分子インプリントをホストするための、化学合成によって生成された空洞などを、生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として被着させることができる。

#### 【0054】

最後に挙げたタイプの認識要素は、「分子インプリンティング」として文献に記載された方法によって製造される空洞をいう。この手法では、大部分は有機溶液中の分析対象物又は分析対象物類似体をポリマー構造中に封入する。すると、これが「インプリント」と呼ばれる。そして、適切な試薬の添加により、分析対象物又はその類似体をポリマー構造から溶解させ、ポリマー構造中に空洞を残す。そして、この空洞を、分析対象物測定のためのその後の方法で、高い立体選択性をもつ結合サイトとして使用することができる。

## 【0055】

また、全細胞又は細胞断片を生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素として被着させることができる。

## 【0056】

多くの場合、いわゆる非特異的結合によって生じる信号、すなわち、たとえば疎水性吸着又は静電氣的相互作用によって、提供された固定化された生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素の区域で拘束されるだけでなく、これらの認識要素によって占有されないセンサプラットフォームの区域でも拘束される分析対象物又は分析対象物測定に加えられる他の成分の結合によって生じる信号による分析方法の検出限界。したがって、非特異的結合又は吸着を最小限にするため、分析対象物に対して「化学的に中性」である化合物が横方向に分けられた計測区域（d）の間に被着されるならば、それは有利である。「化学的に中性の」化合物としては、分析対象物又は分析対象物の類似体又は多工程検定におけるさらなる結合相手の認識及び結合のための特異的結合場所を有さず、その存在のため、分析対象物又はその類似体又はさらなる結合相手のセンサプラットフォームの表面へのアクセスを阻止するような化合物がそう呼ばれる。

## 【0057】

たとえばウシ血清アルブミン又はポリエチレングリコールからなる群の化合物を「化学的に中性の」化合物として被着することができる。

## 【0058】

多くの用途の場合、格子構造（c）が均一な周期の回折格子であるならば、それは有利である。その場合、格子構造（c）によって励起光を計測区域に向けて内結合するための共振角は、格子構造の全区域で均一である。しかし、有意に異なる波長の異なる光源からの励起光を内結合することを意図するならば、内結合のための対応する共振角は大きく異なることができ、センサプラットフォームを収容する光学系の中のさらなる調節用部品の必要性又は空間的に非常に不適当な結合角につながるおそれがある。たとえば結合角の大きな違いを減らすためには、格子構造（c）が多重回折格子であるならば、それは有利であることができる。

## 【0059】

励起光束の平行性及び共振角の正確な調節に対する要求を軽減するため、格子構造(c)が、層(a)中の内結合された光の伝播方向に対して平行又は垂直に、横方向に変化する周期数を有するならば、それは有利であることができる。そして、大きな区域を照射する収束的又は散開的に投射される光束から、格子構造上の、共振条件が満たされる場所で内結合が起こる。

## 【0060】

特に、層(a)中の内結合された光の伝播方向に対して平行又は垂直に横方向に変化する周期数を有するそのような格子構造は、一つ以上のルミネセンスの測定他に、計測区域における有効屈折率の変化を測定する方法を可能にする。この方法に関して、一つ以上のルミネセンス及び/又は励起波長の光信号の測定が偏光選択的な方法で実施されるならば、それは有利であることができる。

## 【0061】

信号バックグラウンド比を改善するために、一つ以上のルミネセンスが、励起光の偏光とは異なる偏光で計測されるならば、さらにそれは有利であることができる。

## 【0062】

第二の光学的に透明な層(b)の材料は、石英、ガラス又はたとえばポリカーボネート、ポリイミドもしくはポリメチルメタクリレートからなる群の透明な熱可塑性プラスチックを含むことができる。

## 【0063】

光学的に透明な層(a)の表面に可能な限り強い減衰フィールドを発生させるためには、光学的に透明な導波層(a)の屈折率が隣接層の屈折率よりも有意に高いことが望ましい。第一の光学的に透明な層(a)の屈折率が2よりも高いならば、それは特に有利である。

## 【0064】

第一の光学的に透明な層(a)は、たとえば、 $TiO_2$ 、 $ZnO$ 、 $Nb_2O_5$ 、 $Ta_2O_5$ 、 $HfO_2$ 又は $ZrO_2$ を含むことができる。第一の光学的に透明な層(a)が $TiO_2$ 又は $Ta_2O_5$ を含むならば、それは特に好ましい。

## 【0065】

光学的に透明な導波層（a）の屈折率の他にも、その厚さが、より低い屈折率の隣接層との界面でできるだけ強い減衰フィールドを発生させるための第二の重要なパラメータである。層厚さが少なくとも一つの励起波長モードを誘導するのに十分である限り、導波層（a）の厚さの減少とともに減衰フィールドの強さが増す。それにより、モードを誘導するための最小「カットオフ」層厚さは、このモードの波長に依存する。「カットオフ」層厚さは、短めの波長の光の場合よりも長めの波長の光の場合の方が大きい。しかし、「カットオフ」層厚さに近づくと、望まれない伝播損失もまた強く増大し、それにより、さらに、好ましい層厚さの選択の下限をセットする。

## 【0066】

好ましいものは、所与の励起波長で一つから三つのモードだけを誘導することができる光学的に透明な層（a）の層厚さである。特に好ましいものは、この所与の励起波長で単モード導波路を提供する層厚さである。誘導される光の離散的（不連続的）モードの特性は横モードだけに関することを理解しなければならない。

## 【0067】

これらの要件の結果として、第一の光学的に透明な層（a）の厚さは、好ましくは40～300 nmである。第一の光学的に透明な層（a）の厚さが70～160 nmであるならば、それは特に有利である。

## 【0068】

光学的に透明な導波層（a）及び隣接層の屈折率が所与であると、上記共振条件にしたがって励起光を内結合するための共振角は、内結合される回折オーダー、励起波長及び格子周期に依存する。第一の回折オーダーの内結合は、内結合効率を増すのに有利である。内結合効率の量のためには、回折オーダーの数の他に、格子深さが重要である。原則として、結合効率は、格子深さが増すとともに増大する。しかし、外結合の過程が内結合に対して完全に逆であるため、外結合効率が同時に増し、その結果、格子構造（c）又はそれに隣接して位置する計測区域（d）におけるルミネセンスの励起に最適値が得られる。この最適値は、計測区域及

び投射される励起光束の形状に依存する。これらの境界条件に基づき、格子（c）が200 nm～1000 nmの周期を有し、3 nm～100 nm、好ましくは10 nm～30 nmの変調深さを有するならば、それは有利である。

#### 【0069】

以下、本発明の実施態様で例示するように、励起光及び／又は逆結合されたルミネセンス光の不完全な内結合及び外結合により、連続格子構造上で、一つの計測区域内又はいくつかの計測区域にまたがって、内結合された励起光の伝播方向に対して平行に誘導される励起光及び／又は発生するルミネセンス光の強さのプラス勾配を生成することが可能であり、この勾配は、格子深さによって制御することができる。この勾配は、拡張された本質的に平行な励起光束によって内結合条件下で同時に照射される格子構造の各区域に沿って内結合された励起光の伝播方向にさらに内結合される励起光の量よりも小さい励起光の一部の外結合から生じる。これらの条件下で、その結果として、全体で利用可能な励起光の強さは、誘導される光の伝播方向に、連続格子構造上の照射区域の端部に向かって増大する。利用可能な励起光の強さのこの勾配は、ダイナミックレンジの拡張に利用することができるという利点を有する。

#### 【0070】

所与の残りのパラメータに関して、内結合及び外結合の効率は、本質的には格子深さによって決まる。したがって、格子（c）が内結合される励起光の伝播方向に対して平行に横方向に変化する格子深さを有するならば、誘導される励起光及び／又は励起されるルミネセンス光の強さの該勾配をさらに影響し、制御することができる。

#### 【0071】

対照的に、内結合される励起光の、光学的に透明な導波層の中での伝播損失は、その伝播方向に沿って、誘導される励起光のマイナスの勾配につながる。相应に、光学的に透明な層（a）における伝播損失の程度によって制御することができる一つの計測区域内及び／又はいくつかの計測区域にかけて誘導される励起光及び／又は発生したルミネセンス光の強さのマイナス勾配を、内結合される励起光の伝播方向に対して平行に生成することが可能である。伝播損失の程度は、た

例えば、発生させるルミネセンスに干渉しない吸収性分子で導波層を特定にドーピングすることによって、又はそのような吸収性分子を導波層に被着させることによって調整することができる。

【0072】

さらには、第一の光学的に透明な層（a）の厚さに対する格子の変調深さの比は0.2以下であることが好ましい。

【0073】

そのため、格子構造（c）は、矩形、三角形又は半円形の断面のレリーフ格子であることもできるし、本質的に平面的な光学的に透明な層（a）における周期変調を有する位相又は容積格子であることもできる。

【0074】

さらには、ルミネセンスの増強又は信号ノイズ比の改善のためには、好ましくは金又は銀の薄い金属層が、光学的に透明な層（a）と、層（a）よりも低い屈折率の、場合によっては、たとえばシリカ又はフッ化マグネシウムのさらなる誘電層の上に固定化された生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素との間に被着され、金属層及び場合によるさらなる中間層の厚さが、励起波長及び／又はルミネセンス波長で表面プラズモンを励起することができるような方法で選択されるならば、それは有利であることができる。

【0075】

さらには、光学系における調節の簡素化及び／又は分析系の一部としてのサンプル区画の接続のための光学的又は機械的に認識可能な印がセンサプラットフォーム上に設けられるならば、それは有利であることができる。

【0076】

本発明のもう一つの主題は、  
少なくとも一つの励起光源と、  
上記実施態様の少なくとも一つのセンサプラットフォームと、  
センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域（d）から発する光を収集するための少なくとも一つの検出器と  
を含む、一つ以上のルミネセンスを測定するための光学系である。



## 【0077】

感度に対して非常に高い要求のない用途の場合、励起光が直接又は透過照射の簡単な配置で計測区域に投射されるならば、それは有利であることができる。このような配置は、光学系における本発明のセンサプラットフォームの配置に対する有意に軽減された要求と関連する。特に、このような配置は、多くの市販ルミネセンス励起及び検出系、たとえばスキャナ系におけるセンサプラットフォームの使用を可能にする。そのため、ルミネセンス光の検出は、格子構造(c)又は(c')によって外結合されるルミネセンスが同じく検出器によって収集されるような方法で実施されることが好ましい。

## 【0078】

しかし、最も深い検出限界を達成するためには、励起光が内結合条件下で格子構造(c)又は(c')に投射されるならば、それは有利である。

## 【0079】

そのため、少なくとも一つの光源から発される励起光がコヒーレントであり、光学的に透明な層(a)への結合のための共振角で一つ以上の計測区域に投射されるならば、それは有利である。

## 【0080】

しかし、計測区域の外側から発するルミネセンス信号を減らすためには、少なくとも一つの光源からの励起光が、回折光学要素又は、光源が多数ある場合には、好ましくはDammann格子である多数の回折光学要素又は好ましくはマイクロレンズアレイである屈折光学要素によって可能な限り均一な強さの複数の個々の光線に分割され、個々の光線が、互いに対して本質的に平行に、横方向に分けられた計測区域に投射されるならば、それはまた有利であることができる。

## 【0081】

一つの光源の強さが不十分である場合又はたとえば生物学的用途のために異なる発光波長をもつ光源が必要である場合、同様な又は異なる発光波長の二つ以上のコヒーレント光源が励起光源として使用されるならば、それは有利である。異なる発光波長の光源の場合、二つ以上のコヒーレント光源からの励起光が異なる方向から同時又は順次に、異なる周期数の格子構造を重ね合わせたものを含む格

子構造(c)に投射されるならば、それは有利である。

#### 【0082】

多数の計測区域からの信号を別々に記録するためには、横方向に解像する検出器を信号検出に使用することが好ましい。そのため、たとえばCCDカメラ、CCDチップ、フォトダイオードアレイ、アバランシェダイオードアレイ、マルチチャネルプレート及びマルチチャネル光電子増倍管からなる群の少なくとも一つの検出器を、少なくとも一つの横方向に解像する検出器として使用することができる。

#### 【0083】

本発明の光学系では、前記実施態様のいずれかにしたがって、伝送された光束を成形するためのレンズもしくはレンズ系、光束を偏向させ、場合によってはさらに成形するための平面もしくは湾曲したミラー、光束を偏向させ、場合によってはスペクトル分離するためのプリズム、光束の部分をスペクトル選択的に偏向させるための二色性ミラー、伝送される光の強さを調整するためのニュートラルフィルタ、光束の部分をスペクトル選択的に透過させるための光学フィルタもしくはモノクロメータ又は励起もしくはルミネセンス光の離散的な偏光方向を選択するための偏光選択要素からなる群の光学部品を、一つ以上の励起光源と前記実施態様のいずれかのセンサプラットフォームとの間及び／又は該センサプラットフォームと一つ以上の検出器との間に配置することができる。

#### 【0084】

多くの用途の場合、励起光が1 fsec~10 minの間隔のパルスで投射されるならば、それは有利である。

#### 【0085】

運動計測のため、又はサンプル又は光学系もしくはセンサプラットフォームそのものの材料中の蛍光汚染物からの高速減衰蛍光の区別のためには、計測区域からの発光が時間分解的に計測されるならば、それは有利であることができる。

#### 【0086】

さらには、本発明の光学系が、計測区域の他にも、参照のため、光源の位置での励起光又は拡大後の励起光又は個々のビームに分割された後の励起光、一つ以

上の横方向に分けられた計測区域の位置からの励起波長の散乱光及び格子構造（c）によって外結合された励起波長の光からなる群の光信号を計測するための部品を含むことが好ましい。そのため、発光の測定のための計測区域と基準信号の測定のための計測区域とが同一であるならば、それは特に有利である。

#### 【0087】

励起光の投射及び一つ以上の計測区域からの発光の検出はまた、一つ以上の計測区域で順次に実施することもできる。そのため、ミラー、偏向プリズム及び二色性ミラーからなる群の可動光学部品を使用して、順次の励起及び検出を実施することができる。通常、励起光線が、たいていは可動ミラーにより、分析される区域にわたって順次に走査される生物分析アレイイメージング系における順次励起及び検出には、市販のいわゆるスキャナが使用される。大部分の走査系の場合、非照射区域と励起光線との間の角度が変化する。しかし、励起光線を本発明のセンサプラットフォームの導波層に内結合する共振条件を満たすためには、この角度が本質的に一定のままであるべきである。すなわち、本発明の光学系で実現されるスキャナは、角度保存的に機能しなければならない。この要件は、いくつかの市販のスキャナによって満たされる。しかし、同時に、センサプラットフォーム上の励起区域の大きさを変更すべきではない。したがって、本発明のもう一つの主題は、本質的に焦点及び角度保存的なスキャナを使用して順次の励起及び検出が実施される光学系である。

#### 【0088】

もう一つの実施態様では、センサプラットフォームは、順次の励起及び検出の過程の間で動かされる。この場合、一つ以上の励起光源及び検出に使用される部品は、空間的に固定された位置に配置することができる。

#### 【0089】

本発明の主題はまた、センサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域上の少なくとも一つのサンプル中の一つ以上の分析対象物をルミネセンス検出によって測定するための、

前記実施態様のいずれかのセンサプラットフォームと、

前記実施態様のいずれの光学系と、

一つ以上のサンプルをセンサプラットフォーム上の計測区域と接触させるための供給手段とを含む完全な分析系である。

#### 【0090】

分析系が、一つ以上の計測区域又はセグメントに組み合わされた計測区域の区域に少なくともある、センサプラットフォームに向けて開口した一つ以上のサンプル区画をさらに含むならば、それは有利である。そのため、サンプル区画それぞれは、 $0.1\text{ nl} \sim 100\text{ }\mu\text{ l}$ の容積を有する。

#### 【0091】

センサプラットフォームは、閉流系及び開放系のいずれで作動させることもできる。最初の場合、分析系は、サンプル区画が、光学的に透明な層（a）とは反対側にある、サンプルの供給又は吐き出しのための入口及び／又は出口を除き、閉じられるような方法で構成され、サンプル及び場合によってはさらなる試薬の供給又は吐き出しが系を通して閉鎖流で実施され、共通の入口及び出口開口を有するいくつかの計測区域又はセグメントへの液体供給の場合、これらの開口は、好ましくは、行ごと又は列ごとに指定される。

#### 【0092】

開口系の場合、本発明の分析系は、サンプル区画が、光学的に透明な層（a）にとは反対側に、サンプル又は他の試薬の場所指定供給又は取り出しのための開口を有するような方法で構成されている。さらには、一つ以上の分析対象物の測定の間、検定の間に湿潤され、計測区域と接触させられる試薬のための区画を設けてもよい。

#### 【0093】

更なる本発明の主題は、プラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）のアレイからの一つ以上のルミネセンスを同時に測定するための、センサプラットフォーム上の少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域上の一つ以上のサンプル中の一つ以上の分析対象物のルミネセンス検出による同時測定の方法であって、

第一の光学的に透明な層（a）が、層（a）よりも低い屈折率の第二の光学的に透明な層（b）の上にあり、

少なくとも二つ以上の計測区域又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）の面積において連続的に変調する格子構造（c）を有し、

少なくとも二つ以上の横方向に分けられた計測区域（d）又はいくつかの計測区域を含む少なくとも二つ以上の横方向に分けられたセグメント（d'）を有し、

計測区域と接触するサンプル中の一つ以上の分析対象物の定性的又は定量的測定のための、計測区域に固定化された同種又は異なる生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素（e）を有する光学膜導波路を含み、

センサプラットフォーム上の計測区域の密度が平方センチメートルあたり少なくとも計測区域16個であり、

計測区域中又はセグメント内で発生し、膜導波路の光学的に透明な層（a）に逆結合されるルミネセンスの、隣接計測区域又は隣接セグメントへのクロストークを、該計測区域又はセグメントの面積において連続的に変調する格子構造（c）によってこのルミネセンス光を外結合することによって防ぐ方法である。

#### 【0094】

このため、計測区域の励起光を格子構造（c）によって光学的に透明な層に結合することが好ましい。

#### 【0095】

本発明の上記方法は、（1）等方向に発されたルミネセンス又は（2）光学的に透明な層（a）に逆結合され、格子構造（c）によって外結合されるルミネセンス又は両方の部分（1）及び（2）のルミネセンスを同時に計測することを可能にする。

#### 【0096】

また、本発明の主題は、上記実施態様のいずれかの光学系を、上記実施態様の少なくとも一つのセンサプラットフォームとともに含む上記実施態様のいずれかの分析系を使用して、ルミネセンス検出によって一つ以上の分析対象物を測定す

る方法であって、一つ以上の分析対象物に関して試験される一つ以上の液体サンプルをセンサプラットフォーム上の一つ以上の計測区域と接触させ、サンプル中又は計測区域上の、発光することができる化合物を励起してルミネセンスを発させ、その発せられたルミネセンスを計測する方法である。

#### 【0097】

さらなる展開された実施態様として、一つの計測区域内及び／又はいくつかの計測区域にかけて内結合される励起光の伝播方向に対して平行に誘導される励起光及び／又は励起ルミネセンス光の制御可能な勾配によって信号計測及び／又は分析対象物定量のダイナミックレンジを増大又は抑制することができる方法の特許請求する。

#### 【0098】

ルミネセンス又は蛍光の発生のために、本発明の方法では、励起されることができ、300 nm～1100 nmの波長で発光するルミネセンス又は蛍光標識を使用することができる。ルミネセンス又は蛍光標識は、従来のルミネセンス又は蛍光染料であってもよいし、半導体に基づく発光又は蛍光ナノ粒子であってもよい（W. C. W. Chan及びS. Nieの「Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection」 Science 281 (1998) 2016-2018）。

#### 【0099】

ルミネセンス標識は、分析対象物に結合することもできるし、競合検定では、分析対象物類似体に結合することもできるし、多工程検定では、固定化された生物学的もしくは生化学的又は合成認識要素の結合相手の一つ又は生物学的もしくは生化学的又は合成の認識要素に結合することもできる。

#### 【0100】

さらには、第一のルミネセンス標識と同種又は異なる励起波長の第二又はそれ以上のルミネセンス標識及び同種又は異なる発光波長を使用することができる。これにより、第二又はそれ以上のルミネセンス標識が、第一のルミネセンス標識と同じ波長で励起されることができ、他の波長で発光するならば、それは有利であることができる。

#### 【0101】

他の用途では、加えられる発光染料の励起スペクトルと発光スペクトルとが重複しないか、部分的にしか重複しないならば、それは有利であることができる。

【0102】

本発明の方法では、供与体として働く第一の発光染料から受容体として働く第二の発光染料への電荷又は光エネルギーの移動を分析対象物の検出に使用するならば、それはさらに有利であることができる。

【0103】

さらには、一つ以上のルミネセンスの測定他に、計測区域における有効屈折率の変化を測定するならば、それは有利であることができる。それにより、一つ以上のルミネセンス及び／又は励起波長での光信号の測定が偏光選択的に実施されるならば、それはさらに有利であることができる。さらには、方法は、励起光の偏光とは異なる偏光で一つ以上のルミネセンスを計測することを可能にする。

【0104】

本発明の方法は、抗体もしくは抗原、受容体もしくはリガンド、キレート化剤もしくは「ヒスチジンタグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNAもしくはRNAストランド、DNAもしくはRNA類似体、酵素、酵素補因子もしくは阻害薬、レクチン及び炭水化物からなる群の一つ以上の分析対象物の同時又は順次、定量的又は定性的測定を可能にする。

【0105】

試験するサンプルは、天然の体液、たとえば血液、血清、血漿、リンパ液もしくは尿又は卵黄であることができる。

【0106】

試験するサンプルはまた、光学的に濁った液体、表面水、土壌又は植物抽出物又はバイオもしくはプロセスブロスであることができる。

【0107】

試験するサンプルはまた、生物学的組織から採取することができる。

【0108】

本発明のさらなる主題は、薬学研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発における化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の選抜法での決

定、親和性選抜及び研究におけるリアルタイム結合研究及び運動パラメータの決定、定性的及び定量的な分析対象物測定、特にDNA及びRNA分析論、医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における毒性発生研究及び発現プロファイルの決定及び抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定、医薬品開発及び治療薬選択における患者の層別化、食品及び環境分析論における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、上記実施態様のいずれかの方法の使用である。

### 【0109】

以下の例で本発明をさらに説明し、実証する。

### 【0110】

#### 例1

a) 二つの別個の格子構造ならびに多数の計測区域及び複数の計測区域の1つのセグメントを有するセンサプラットフォーム

幅16 mm×長さ48 mm×厚さ0.5 mmの外寸のセンサプラットフォームを使用した。基材（光学的に透明な層（b））は、Corningガラス7059（488 nmでの屈折率 $n = 1.538$ ）からなるものであった。スピンコートによって被着されたフォトレジストで覆われた層（b）をホログラフィー露光したのち、センサプラットフォーム上に形成されない区域をマスキングしながら湿式化学エッチングすることにより、周期320 nm及び格子深さ12+/-3 nmの表面レリーフ格子の二つの構造を基材中に生成した。格子は、それぞれ長さ5 mm×幅12 mm（格子構造I）及び長さ1 mm×幅12 mm（格子構造II）の寸法であり、格子線がセンサプラットフォームの所与の幅に対して平行な向きにあった。20 mmの内側距離で励起光を内結合し、導波層（a）中で誘導するため、格子構造をセンサプラットフォーム上でそれらの内側に関して中心対称に配置した。イオンめっきしたのち、300℃で焼き戻す（テンパリング）ことにより、光学的に透明な層（b）上に光学的に透明な導波層（a）を形成すると（R. E. Kunz、J. Edlingerらの「Grating couplers in tapered waveguides for integrated optical sensing」 Proc. SPIE vol. 2068 (1994), page 321を参照）、488 nmで2.317の屈折率を示した（層厚さ150 nm）。格子構造が被着法によっ



て一定の比にしたがってほぼ1 : 1で移される導波層 (a) の格子深さを後でAFM (原子間力顕微鏡) によって制御した。以下の例 (4. b) 計測法では、格子構造 (I) を、励起光を上部の計測区域、格子構造 (I) と (II) との間に位置する計測区域にそれぞれ内結合するための連続格子構造として使用した。セグメントを形成する後者の計測区域は、誘導され、逆結合されたルミネセンス光及び誘導された励起光の、格子構造 (II) による外結合により、この場合は外結合格子として働く格子構造 (II) よりも上に位置する可能なさらなる計測区域又はセグメントへのクロストークを防止される。

#### 【0111】

生化学的もしくは生物学的又は合成の認識要素の固定化の準備として、センサプラットフォームを清浄し、エポキシシランによって液相中でシラン化した (オルト-キシレン 500 ml 中 10 ml (2 % v/v) 3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン及び 1 ml (2 % v/v) N-エチルジイソプロピルアミン ( $d = 0.881 \text{ g/cm}^3$ ,  $m = 440.5 \text{ g}$ ))。次に、16マーオリゴヌクレオチド ( $\text{NH}_2-3' \text{ C A A C A C A C C T T A A C A C}-5'$ 、被着溶液の濃度: 0.34 mM、スポットあたり 3 nl) の溶液を市販のスポットで被着し、それにより、格子構造 (I) 上及び格子構造 (I) 及び (II) の間の区域に直径 140 ~ 150  $\mu\text{m}$  のほぼ円形の計測区域を 600  $\mu\text{m}$  の距離 (中心間) の 6 × 6 アレイに生成した。

#### 【0112】

b) 連続格子構造上に多数の感知区域を有するセンサプラットフォーム

幅 16 mm × 長さ 48 mm × 厚さ 0.7 mm の外寸のセンサプラットフォームを使用した。基材 (光学的に透明な層 (b)) は、AF45 ガラス (633 nm での屈折率  $n = 1.52$ ) からなるものであった。スピンコートによって被着されたフォトレジストで覆われた層 (b) をホログラフィー露光したのち、湿式化学エッチングすることにより、周期 364 nm 及び格子深さ  $25 \pm 5 \text{ nm}$  の表面レリーフ格子の連続構造を基材中に生成した。格子線は、センサプラットフォームの所与の幅に対して平行になる向きであった。反応性磁場増強 DC スパッタリング (DE4410258 を参照) により、光学的に透明な層 (b) 上に光学的に透明な

Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>導波層 (a) を生成すると、633 nmで2.15の屈折率を示した(層厚さ150 nm)。格子構造が被着法によって一定の比にしたがってほぼ1:1で移される導波層 (a) の格子深さを後でAFM (原子間力顕微鏡) によって制御した。

### 【0113】

生化学的もしくは生物学的又は合成の認識要素の固定化の準備として、上記のように、センサプラットフォームを清浄し、エポキシシランによって液相中でシラン化した。そして、16マーオリゴヌクレオチド(被着溶液の濃度: 0.34 mM、スポットあたり3 nl) の溶液を市販のスポットで被着し、それにより、連続格子構造上に直径140~150 μmのほぼ円形の計測区域を600 μmの距離(中心間)の6×6アレイで生成した。

### 【0114】

例2

光学系

a) 励起モジュール

例1aで記載したセンサプラットフォームへの内結合のため、センサプラットフォームをコンピュータ制御調節モジュールに取り付けて、格子線に対して平行及び垂直な並進ならびに格子構造(I)に投射される励起光線によって照射される区域の主軸に運動中心をもつ回転を可能にした。励起光源として働くレーザの直後に、計測データを収集しないときに光路を遮るためのシャッタを光路中に設けた。さらには、励起光の強さを段階的又は連続的に変えるため、ニュートラルフィルタ又は偏光子を、励起光路中のこの位置又は他の位置にセンサプラットフォームに向けて取り付けた。

### 【0115】

励起モジュールa. i) /センサプラットフォーム1. a)

さらなる光線成形部品を使用することなく、ヘリウムネオンレーザ(2 mW) から励起光線を格子構造Iの右エッジに投射した。励起光線スポットの大きさは、励起レーザ光線の直径と一致した。センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内結合モード沿いの散乱によって発される散乱

光の最大強さによって確認した。この最大値は、目視検査によって決定すること  
もできるし、イメージングシステムによって収集された励起モードに沿いの散乱  
光を、CCDカメラの画素のような光電子検出器、たとえば横方向に解像する検  
出器又はフォトダイオード、たとえば横方向に解像しない検出器にイメージング  
することによって決定することもできる。同じ内結合条件の下、誘導励起光のた  
めの第二の格子構造IIの外結合角で配置された第二の光電子検出器によって最大  
信号を計測した。内結合の共振角として $-3.8^{\circ}$ の角度を測定した。

#### 【0116】

励起モジュール a. ii) / センサプラットフォーム 1. a)

円柱形レンズを含むレンズの組み合わせにより、ヘリウムネオンレーザ ( $2\text{ mW}$ )  
からの励起光線を、スリット型断面 (センサプラットフォームの格子線に対し  
て平行) をもつ光ビームに拡大した。格子線に対して平行にわずかに散開するが  
、格子線に対して直交する投射で平行である励起光束の上下の境界領域をスリッ  
トによってマスクした。格子構造上のスリット型断面をもつ得られた光束を格子  
構造 I の右エッジに向けた。励起光は、長さ  $1\text{ mm}$  × 幅  $1.2\text{ mm}$  のサイズであった。  
センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内  
結合モード沿いの散乱によって発される散乱光の最大強さによって確認した。こ  
の最大値は、目視検査によってけっしていすることもできるし、イメージングシス  
テムによって収集された励起モードに沿いの散乱光を、CCDカメラの画素のよ  
うな光電子検出器、たとえば横方向に解像する検出器又はフォトダイオード、た  
とえば横方向に解像しない検出器にイメージングすることによって決定すること  
もできる。同じ内結合条件の下、誘導励起光のための第二の格子構造IIの外結合  
角で配置された第二の光電子検出器によって最大信号を計測した。内結合の共振  
角として $-3.9^{\circ}$ の角度を測定した。

#### 【0117】

励起モジュール a. iii) / センサプラットフォーム 1. a)

Dammann格子により、この格子の線に対して平行な直線配置で、ヘリウムネオ  
ンレーザからの励起光を16個のビームに分割した。格子バー及び溝の不規則な  
順序は、製造業者により、すべての偶数回折オーダー、特にゼロオーダーが抑制され

、奇数回折オーダーに関して可能な限り均一な強さが達成される（偏差5%未満）ような方法で最適化した。センサプラットフォームに向く方向にある、Dammann格子の背後の非球形レンズ（Dammann格子は該レンズの焦点にある）を使用して、Dammann格子の背後の散開する光線から平行な個々のビームの束を形成した。Dammann格子から出る個々のビームの開き及び背後に位置するレンズの焦点距離を、センサプラットフォーム上の光線の間にも所望の間隔が生成されるような方法で均衡させた。

#### 【0118】

実例では、使用するDammann格子によって16個のビームを生成し、そのうち8個を、スリット型開口に通したのち、偏向プリズムにより、内結合格子として働く格子構造Iの右エッジに向けた。内結合条件は、内結合され、導波層（a）中で誘導される個々のビーム沿いの散乱光の同時最大強さによって確認されたように、8個の光線に関して同時に満たすことができた。結合角は $-3.8^\circ$ であった。

#### 【0119】

励起モジュールa. iv) / センサプラットフォーム1. a)

25倍拡大光学部品により、ヘリウムネオンレーザからの632.8 nmの励起光ビームを、直径2 cmの円形断面の平行光束に拡大した。この励起光束の中央部分から、長さ1 mm×幅9 mmの区域（格子構造の命名法に準じる）を選択し、格子構造Iの右エッジに投射した（内結合し、誘導する励起光の方向で）。センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内結合モード沿いの散乱によって発される散乱光の最大強さによって確認した。この最大値は、目視検査によって決定することもできるし、イメージングシステムによって収集された励起モードに沿いの散乱光を、CCDカメラの画素のような光電子検出器、たとえば横方向に解像する検出器又はフォトダイオード、たとえば横方向に解像しない検出器にイメージングすることによって決定することもできる。同じ内結合条件の下、誘導励起光のための第二の格子構造IIの外結合角で配置された第二の光電子検出器によって最大信号を計測した。

#### 【0120】

内結合の共振角として $-3.8^\circ$ の角度を測定した。非回折透過励起光の量をセンサプラットフォームの位置の背後でレーザ出力計によって計測した。利用可能な励起強さとして $88\mu\text{W}$ の値を測定した（光路中にセンサプラットフォームがない）。透過量は、センサプラットフォームを光路に配置しているが、導波層に内結合しない状態で $79\mu\text{W}$ に達した。内結合が起こると、この値は $21\mu\text{W}$ 、すなわち、利用可能な全励起光の24%に低下した。

#### 【0121】

励起モジュール a. v) / センサプラットフォーム 1. a)

25倍拡大光学部品により、ヘリウムネオンレーザからの $632.8\text{nm}$ の励起光ビームを、直径 $2\text{cm}$ の円形断面の平行光束に拡大した。この励起光束の中央部分から、長さ $4\text{mm}$ ×幅 $9\text{mm}$ の区域（格子構造の命名法に準じる）を選択し、まず格子構造 I の右エッジに向けた（内結合し、誘導する励起光の方向）。センサプラットフォームを最大内結合に調節し、それを、誘導される励起光の内結合モード沿いの散乱によって発される散乱光の最大強さによって確認した。内結合の共振角として $-4^\circ$ の角度を測定した。そして、センサプラットフォームを、励起光によって照射される長さ $4\text{mm}$ の区域が長さ $5\text{mm}$ の格子構造の中心に位置するまで、角度を変えずに横方向に並進させた。非回折透過励起光の量をセンサプラットフォームの位置の背後でレーザ出力計によって計測した。利用可能な励起強さとして $250\mu\text{W}$ の値を測定した（光路中にセンサプラットフォームがない）。透過量は、センサプラットフォームを光路に配置しているが、導波層に内結合しない状態で $240\mu\text{W}$ に達した。内結合が起こると、この値は $51\mu\text{W}$ 、すなわち、利用可能な全励起光の20%に低下した。

#### 【0122】

b) 検出モジュール

(i) 多数の計測区域からの同時信号記録 (Ausmessung) のための検出系

(I) ベルチェ冷却（作動温度 $-30^\circ\text{C}$ ）を備えたCCDカメラ (TE3/A Astro cam、英国Cambridge) を横方向解像検出器として使用した。 $35\text{mm}$ のニコン対物レンズ (Nikkor  $35\text{mm}$ ) によってCCDチップに対する信号収集及び合焦を実施した。中心波長 $679\text{nm}$ 及び帯域幅 $25\text{nm}$ の干渉フィルタ (Omega Optical、

バーモント州Brattleborough) 2個を対物レンズとCCDチップとの間、干渉フィルタの効率を有意に損なわない、光路のわずかに収束する部分に配置した。ハイブリダイゼーション緩衝液の供給によって収集した横方向に解像された信号を、発光トレーサプローブなしで、相補的な発光標識トレーサ分子とのハイブリダイゼーションによるルミネセンス信号に関して時間的にずらして、バックグラウンド信号の測定及び参照の両方に使用した。

#### 【0123】

(II) ペルチェ冷却(作動温度 $-30^{\circ}\text{C}$ )を備えたCCDカメラ(TE3/A Astrocam、英国Cambridge)を横方向解像検出器として使用した。Heligon Tandem対物レンズ(Rodenstock、 $2\times\text{XR Heligon } 1.1/50\text{ mm}$ )によってCCDチップに対する信号収集及び合焦を実施した。中心波長 $679\text{ nm}$ 及び帯域幅 $25\text{ nm}$ の干渉フィルタ(Omega Optical、バーモント州Brattleborough) 2個ならびにニュートラルフィルタ(減衰した散乱励起光及びはるかに弱いルミネセンス光を計測区域から伝送するため)又はニュートラルフィルタと干渉フィルタとの組み合わせ(減衰した励起光を計測区域から伝送するため)を、Heligon Tandem対物レンズの二つの部分の間でフィルタホイールに取り付けた。励起及びルミネセンス波長の信号を交互に計測した。

#### 【0124】

(III) ペルチェ冷却(作動温度 $-30^{\circ}\text{C}$ )を備えたCCDカメラ(TE3/A Astracam、英国Cambridge)を横方向解像検出器として使用した。前記例と同様、Heligon Tandem対物レンズによってCCDチップに対する信号収集及び合焦を実施した。Heligon Tandem対物レンズの二つの部分の間に、検出器に向く発光光路の伝播方向に、まず、ビーム分割板を、フレネル反射によって反射される光の部分(主に励起波長の光からなる)の直交反射に対して $45^{\circ}$ に配置したのち、ルミネセンス光の選択的伝送のために、中心波長 $679\text{ nm}$ 及び帯域幅 $25\text{ nm}$ の干渉フィルタ(Omega Optical、バーモント州Brattleborough) 2個を配置した。ビーム分割板によって発光光路の外に反射される光の部分、直接又は励起波長のための干渉フィルタに通して、横方向に解像又は解像しない検出器に向けた。センサプラットフォーム上の同じ区域から常に出る、計測区域からの参照信号及び

ルミネセンス信号を、上記例と同様、同時に記録した。

#### 【0125】

(ii) 計測区域からの順次信号記録のための検出系

イメージングするセンサプラットフォーム上の計測区域を、該計測区域を1:1の縮尺で開口にイメージングするレンズ系の焦点に配置した。この開口は、対象計測区域外の区域をマスキングすることができた。開口そのものを、同じく系の背後で検出器に向かう方向に平行な光路を生成するように配置された少なくとも2個のレンズを含む系の第一のレンズの焦点に配置した。光路の平行部分には、まず、平行な光路に対して45°で配置される光線分割板を配置した。この光線分割板は、収集した光の、主に励起波長の散乱光からなる部分を、場合によっては該反射光が励起波長の干渉フィルタを通過したのち、フレネル反射によって参照検出器、たとえば増幅器に接続されたフォトダイオードの方向に反射するために使用される。光線分割板の背後でさらに伝播する伝送されたルミネセンス光を、二つの干渉フィルタ (Omega Optical、679 DF025) によって選択し、選択された光電子増倍管を光子計数装置 (Hamamatsu H6240-02セレクト) と組み合わせたものである検出器に合焦させた。

#### 【0126】

異なる計測区域からの信号を順次に記録するため、例2. a)に記載した配置要素によってセンサプラットフォームをx及びy方向に並進させた。

#### 【0127】

同じく、一つの工程で励起し、検出することができる区域よりも大きなセンサプラットフォーム上の区域からの信号収集のため、多数の計測区域の同時励起及び横方向解像検出器による信号収集と、並進工程との組み合わせを実施することができる。

#### 【0128】

例3

分析系

以下に挙げるすべての例は、対応するサンプル区画を有するセンサプラットフォーム及び流体供給システムそれぞれを全体的又は部分的に温度調節することが

できるように設計されている。

### 【0129】

#### (a) 一つの連続閉鎖フローセル+流体系

例1 a) のセンサプラットフォームを例2. a. iv) の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I) の検出モジュールを選択した。センサプラットフォームに向けて開口し、その上の全区域を、構造I及びIIを含め、幅8 mmで取り囲むサンプル室を有する閉鎖サンプル区画を、閉鎖流系における種々の試薬及びサンプルの順次適用に使用した。サンプル区画の材料は、有利には、蛍光を含まない、自己接着性で可撓性で流体シール性の低反射プラスチック、実例として、黒化ポリジメチルシロキサンからなるものであった。サンプル室の深さは0.1 mmであり、サンプル室の全容積として $25 \mu\text{l}$ を与えた。連続サンプル室は、一つの同じサンプル又は試薬をすべての計測区域に同時に塗布するために使用した。入口又は出口として交換可能に使用することができる2つの開口を、センサプラットフォームとは反対側で、サンプル区画の左右のエッジに配置した。シリンジポンプ (Cavro XL 3000、Cavro、米カリフォルニア州Sunnyvale) を使用して、シリンジのサイズに依存して $1 \mu\text{l}$ ~ $10 \mu\text{l}$ の用量精度で、サンプル及び試薬の供給を実施した。シリンジポンプは、市販のオートサンプラ (Gilson 231 XL) 、一つ以上のマルチポート弁及びサンプルループをさらに含む流体系の一部であった。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

### 【0130】

#### (b) 5個の平行な閉鎖流路を有するフローセル+流体系

例1 a) のセンサプラットフォームを例2. a. ii) の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I) の検出モジュールを選択した。閉鎖流系における種々の試薬及びサンプルの順次適用のために、センサプラットフォームに向けて開口する、それぞれ幅1 mmで互いに1 mmの距離をおく平行な5個のサンプル室を有する閉鎖流セルを使用した。サンプル室は、格子構造I及びIIを超えて延びるものであった。サンプル室の深さは0.1 mmであり、各サンプル室の全容積として約 $2.5 \mu\text{l}$ を与えた。上から特定される計測区域に同種又は異なる試薬を



塗布するために5個のサンプル室を使用した。入口又は出口として交換可能に使用することができる2個の開口を、センサプラットフォームとは反対側で、各サンプル区画の左右のエッジに配置した。約 $0.5\mu\text{l}$ の用量精度を可能にするシリンジポンプ (Cavro XL 3000、Cavro、米カリフォルニア州Sunnyvale) を使用して、小さなサイズ ( $50\mu\text{l}\sim 250\mu\text{l}$ ) のシリンジで、サンプル及び試薬の供給を実施した。シリンジポンプは、市販のオートサンプラ (Gilson 231 XL) 、一つ以上のマルチポート弁及び一つ以上のサンプルループをさらに含む流体の一部である。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

#### 【0131】

c) 個別に指定可能な試薬適用のための開口サンプル容器

全センサプラットフォーム上で変調する単回折格子構造を有する例1b) のセンサプラットフォームを例2. a. v) の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I) の検出モジュールを選択した。

#### 【0132】

個別に指定可能な開口サンプル区画へのサンプル及び試薬の付加又はそこからの取り出しを可能にするため、センサプラットフォームを水平に取り付けた。サンプル区画の構造は、厚さ $1\sim 3\text{mm}$ の、自己接着性で流体シール性の黒化ポリジメチルシロキサンプレートから形成した。このプレートには、流体で個別に指定される計測区域又はいくつかの計測区域を合わせたセグメントに幾何学的に一致する多数の連続的に配置された開口 (典型的な直径 $1\text{mm}\sim 3\text{mm}$ ) を挿入しておいた。高いコピー数で対応するマスクから形成することができる、このようにして構成されたPDMSプレート (前記例で記載したサンプル区画と同様) をセンサプラットフォーム表面と接触させると、開口を互いに対して流体シールすることにより、それに付着した。一つのディスペンサ又は並列にした多数のディスペンサにより、等しい又は異なるサンプル及び試薬をサンプル区画に充填するか、そこから取り出した。特に揮発性の高いサンプル又は試薬の場合に蒸発を避けるため、水蒸気の飽和雰囲気存在で流体適用工程を実施した。

#### 【0133】

ディスペンサは、市販のオートサンプラ (Gilson 231 XL)、一つ以上のマルチポート弁及びサンプルループをさらに含む流体系の一部であった。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

#### 【0134】

d) さらなるサンプル区画をもたないディスペンサによるサンプル及び試薬の適用

全センサプラットフォーム上で変調する単回折格子構造を有する例1b)のセンサプラットフォームを例2. a. v)の励起モジュールとともに使用した。例2. b. i. I)の検出モジュールを選択した。

#### 【0135】

個別に指定可能な開口サンプル区画へのサンプル及び試薬の付加又はそこからの取り出しを可能にするため、センサプラットフォームを水平に取り付けた。一つのディスペンサ又は並列にした多数のディスペンサにより、等しい又は異なるサンプル及び試薬を計測区域又はセグメントに個別に指定して塗布するか、一つのディスペンサ又は並列にした多数のディスペンサにより、そこから取り出した。特に揮発性の高いサンプル又は試薬の場合に蒸発を避けるため、水蒸気の飽和雰囲気存在で流体適用工程を実施した。

#### 【0136】

ディスペンサは、市販のオートサンプラ (Gilson 231 XL)、一つ以上のマルチポート弁及びサンプルループをさらに含む流体系の一部であった。一つ以上の弁の切り換え及びポンプによる起動により、異なる試薬又はサンプルを計測区域に向けることができた。

#### 【0137】

例4

ルミネセンス検出法

4. a) 適用溶液

1) リン酸緩衝液 326 ml (0.070 M、pH 7)、KCl 29.5 g、EDTA×2H<sub>2</sub>O 0.09 g、ポリ(アクリル酸) 5100ナトリウム塩 2.25 g

、Tween 20 2.25g、アジ化ナトリウム1.13gを蒸留水で4.5リットルまで充填し、1モル苛性ソーダ液でpH7.7に調節したものからなるハイブリダイゼーション緩衝液（pH7.7）

#### 【0138】

2) サンプル溶液（16 \* c - Cy - 5）：計測区域に固定化されたオリゴマーに対して相補的な16個の塩基対（ハイブリダイゼーション緩衝液1中Cy5 - 5' - GTTG TGTGG AATTGTG - 3'（ $10^{-9}$ M））からなるCy5 - 標識オリゴマー

#### 【0139】

3) 再生溶液：脱イオン水250mlに溶解した、塩化ナトリウム0.22g、クエン酸ナトリウム0.11g、Tween 20 2.5g、ホルムアミド142g及びアジ化ナトリウム0.13g

#### 【0140】

#### 4. b) 計測法

(i) 例1a)のセンサプラットフォームを、例2. a. v)の励起モジュール及び例2. b. i. I)の検出モジュールならびに例3. a)の閉鎖フローセルとともに使用した。

#### 【0141】

計測法は、以下の個々の工程からなるものであった。

ハイブリダイゼーション緩衝液1)で5分間洗浄し（0.5ml/min）、バックグラウンド信号を記録する。

サンプル溶液を5分間供給する（1nM 16 \* c - Cy - 5；0.5ml/min）。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する。

再生溶液を5分間供給する（0.5ml/min）。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する（再平衡化）。

#### 【0142】

計測過程で、計測区域が上に位置するセンサプラットフォームのカメラ画像をルミネセンス波長で1分間隔で記録した。

## 【0143】

(ii) 例1b)のセンサプラットフォームを、例2. a. v)の励起モジュールならびに例2. b. i. I)の検出モジュール及び例3. a)の閉フローセルとともに使用した。

## 【0144】

計測法は、以下の個々の工程からなるものであった。

ハイブリダイゼーション緩衝液1)で5分間洗浄し(0.5 ml/min)、バックグラウンド信号を記録する。

サンプル溶液を5分間供給する(1 nM 16 \* c - Cy - 5 ; 0.5 ml/min)。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する。

再生溶液を5分間供給する工程(0.5 ml/min)。

ハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄する(再平衡化)。

## 【0145】

計測過程で、計測区域が上に位置するセンサプラットフォームのカメラ画像をルミネセンス波長で1分間隔で記録した。

## 【0146】

## 4. c) 結果

以下、計測法4. b. i)にしたがって得られた結果を例として論じる。はじめに、拡大した励起光線ビームを内結合条件下で格子構造Iの中心に向け、長さ4 mm×幅9 mmの直接照射区域を生成した。6×6計測区域(列×行)の一番下の行は、フローセルの境界の近くに位置し、したがって、他の計測区域と同じ条件下で分析対象物の供給が起らなかったため、分析には考慮しなかった。ハイブリダイゼーション工程の後で、以下の平均正味ルミネセンス信号を、これらの計測区域からの絶対信号とバックグラウンド信号との差として測定した(表1、単位「秒あたり計数、cps」)。

## 【0147】

## 【表1】

表 1:

列	1	2	3	4	5	6
行 1	14800	19350	21100	33000	34300	39000
行 2	15600	18410	21800	34900	38010	38300
行 3	14600	17700	19700	32600	32700	41400
行 4	14900	20700	19700	27200	36900	42100
行 5	13500	16300	19100	23700	31000	41300
平均	14680	18492	20280	30280	34582	40420
標準偏差 (%)	5.2	9.0	5.5	15.4	8.4	4.1

## 【0148】

例 1. a) で使用したセンサプラットフォームの場合、 $12 + \sqrt{-3}$  nm の格子深さで、励起光の内結合及び外結合の効率が不完全であり、誘導モードの方向で利用可能な励起光の強さにプラスの勾配を生じ、その結果、表 1 の列数の増大とともに観察されるルミネセンス信号が増大した。一例として、計測区域の行 5 の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンを図 1 にグラフとして示す。

## 【0149】

計測法 4. b. i のさらなる過程で、センサプラットフォームを、格子構造 I の右エッジの近くに内結合された励起光の一部が、光学的に透明な層 (a) の中を、それが外結合される格子構造 II の方向にさらに伝播することができるほど、角度を変えずにその長手側に対して平行に並進させた。励起光が格子構造 I 及び II の間の区域を通過すると、両格子構造の間に位置する、計測区域のセグメントの例としての計測区域の第二の  $6 \times 6$  アレイを励起した。アレイの上寄り二行は、サンプル区画の上境界に位置していた。これらの計測区域からの信号は分析に考慮しなかった。

## 【0150】

ハイブリダイゼーション工程の後で、以下の平均正味ルミネセンス信号を、これらの計測区域からの絶対信号とバックグラウンド信号との差として測定した (表 2、単位「秒あたり計数、cps」)。

【0151】

【表2】

表 2:

列	1	2	3	4	5	6
行 3	27174	18900	18230	17964	13080	11943
行 4	27900	19410	19025	17950	16130	14500
行 5	26033	21530	20667	17025	15217	13000
行 6	24274	22290	17949	16621	14265	11700
平均	26345	21076	18968	17390	14673	12786
標準偏差 (%)	6.0	5.8	6.4	3.9	8.9	10.0

【0152】

この例では、利用可能な誘導された励起光の強さのマイナス勾配に対応する、格子構造 I 及び II の間の光学的に透明な層 (a) 中の伝播損失は比較的高く、結果として、正味ルミネセンス信号は、誘導される励起光の伝播距離の増大又は計測区域の列数の増大とともに有意に減少した (表 2 を参照)。一例として、表 2 の計測区域の行 5 の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンを図 2 にグラフとして示す。

【0153】

この計測法のさらなる過程で、センサプラットフォームとその法線との間の角度を、光学的に透明な層 (a) の中を右に伝播する誘導励起光のモードに通じる  $-4^{\circ}$  から、上記図を参照しながら  $+4^{\circ}$  に変化させた。このようにして、左に伝播するモードの生成のための内結合条件を満たした。

【0154】

このように、内結合条件下で、格子構造 I の計測区域の  $6 \times 6$  アレイの四つの列を励起することができた。したがって、一例として図 3 の計測区域の行 5 の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンで見てとれるように、内及び外結合の不完全な効率のため、左に増大する利用可能な誘導励起光強さの勾配が確立された。

## 【0155】

(ii) 以下、計測法4. b. ii) の結果をさらなる例として論じる。拡大した励起光線を、内結合条件下、均一な格子構造を全センサプラットフォーム上で連続的に変調させたセンサプラットフォーム上に位置する計測区域のアレイに向けた。

## 【0156】

より大きな  $25 + \text{---} 5 \text{ nm}$  の格子深さのおかげで内結合及び外結合の効率ははるかに高く、利用可能な励起光の強さに、計測結果の統計的偏差をほとんど超えない影響を示す非常に小さなプラス勾配が誘導モードの方向に得られた。一例として、計測区域の行5の全ルミネセンス信号、すなわち、バックグラウンド信号を差し引く前のパターンを図4にグラフとして示す。

## 【0157】

例5

a) センサプラットフォーム

(i) 幅  $16 \text{ mm}$  × 長さ  $48 \text{ mm}$  × 厚さ  $0.7 \text{ mm}$  の外寸のセンサプラットフォームを使用した。基材（光学的に透明な層（b））は、AF45ガラス（ $633 \text{ nm}$ での屈折率  $n = 1.52$ ）からなるものであった。反応性磁場増強DCスパッタリングにより、光学的に透明な層（b）上に光学的に透明な  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  層（a）を生成すると、 $633 \text{ nm}$ での  $2.15$  の屈折率を示した（層厚さ  $150 \text{ nm}$ ）。センサプラットフォームは、それぞれ周期  $360 \text{ nm}$  の二つの離れた格子構造を例1a)と同様な配置でさらに含むものであった（長さ  $5 \text{ mm}$  × 幅  $12 \text{ mm}$  及び長さ  $1 \text{ mm}$  × 幅  $12 \text{ mm}$  の寸法、格子深さ  $12 + \text{---} 3 \text{ nm}$ ）。しかし、以下に記載する計測法では、格子構造は、ルミネセンス励起又はルミネセンス検出のために特別には使用しなかった。

## 【0158】

(ii) 幅  $16 \text{ mm}$  × 長さ  $48 \text{ mm}$  × 厚さ  $0.7 \text{ mm}$  の外寸のセンサプラットフォームを使用した。物理パラメータは例1. b)と同様であった。基材（光学的に透明な層（b））は、AF45ガラス（ $633 \text{ nm}$ での屈折率  $n = 1.52$ ）からなるものであった。スピコートによって被着されたフォトレジストで覆われた層（b

) をホログラフィー露光したのち、湿式化学エッチングすることにより、周期  $360\text{ nm}$  及び格子深さ  $25 \pm 5\text{ nm}$  の表面レリーフ格子の連続構造を基材中に生成した。格子線の向きは、センサプラットフォームの所与の幅に対して平行になる。反応性磁場増強 DC スパッタリング (DE 4410258 を参照) により、光学的に透明な層 (b) 上に光学的に透明な  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  導波層 (a) を生成すると、 $633\text{ nm}$  での  $2.15$  の屈折率を示した (層厚さ  $150\text{ nm}$ )。内結合条件下、 $633\text{ nm}$  の励起光を約  $+3^\circ$  の角度で構造に結合した。約  $-6^\circ$  の角度で  $670\text{ nm}$  (Cy5 の蛍光の最大値に対応) の波長の光の内結合又は外結合が起こった。

#### 【0159】

生化学的もしくは生物学的又は合成の認識要素の固定化の準備として、センサプラットフォーム 5. a) (i) 及び (ii) を清浄し、エポキシシランによって液相中でシラン化した (オルト-キシレン  $500\text{ ml}$  中  $10\text{ ml}$  ( $2\% \text{ v/v}$ ) 3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン及び  $1\text{ ml}$  ( $2\% \text{ v/v}$ ) N-エチルジイソプロピルアミン ( $70^\circ\text{C}$  で 7 時間))。蛍光標識された 18 マーオリゴヌクレオチド (Cy5-5'-CCGTAACCTCATGATATT-3'-NH<sub>2</sub>,  $18 \times \text{Cy5-NH}_2$ ) の溶液を、市販のスポット (Genetic Microsystems 417 アレイヤ) で、それぞれ  $16 \times 8$  個のスポット ( $8 \text{ 行} \times 16 \text{ 列}$ 、スポットあたり  $50\text{ pl}$ ) からなる二つのアレイに被着した。塗布した溶液の濃度は、行ごと交互に、 $10^{-7}\text{ M}$  及び  $10^{-6}\text{ M}$   $18 \times \text{Cy5-NH}_2$  であり、その結果、それぞれ  $\mu\text{m}^2$  あたり  $100$  個及び  $10$  個の、被着スポット (直径約  $125\text{ }\mu\text{m}$ 、中心間距離  $375\text{ }\mu\text{m}$ ) 中のフルオロフォア濃度が得られた。

#### 【0160】

それぞれ幅約  $3.2\text{ mm}$   $\times$  長さ  $5.8\text{ mm}$  のスポットアレイをセンサプラットフォーム上に  $3.3\text{ mm}$  間隔の行にアレイして、センサプラットフォーム (i) の場合、両方のアレイが次の結合格子まで数ミリメートルの距離で位置するようにした。

#### 【0161】

##### b) 光学系

収束励起光束の直接照射の配置で励起光を投射することにより、センサプラッ



トフォーム (i) 及び (ii) のスポットアレイからの蛍光強さを市販のスキヤナ (Genetic Microsystems 418 Array Scanner) で計測した。そのために、励起光束の光軸をセンサプラットフォームに対して垂直に向けた。励起光の強さは約 5 mW であった。レーザスキヤナの対物レンズの開口数は、約  $53^\circ$  の半開口角に対応した。走査速度は、製品カタログに記された値に準じていた (18 mm/min、走査幅 22 mm)。

#### 【0162】

さらなる比較のため、センサプラットフォーム (i) (格子構造 I 及び II を有する) 上の計測区域からの蛍光を、平行な励起光束を使用して、格子構造 I (長さ 1 mm × 幅 12 mm、内結合角  $+3^\circ$ ) の右エッジにおける内結合により、内結合条件下で計測した。そのために、例 2 の励起モジュール / 励起モジュール a. ii (ヘリウムネオンレーザからの励起光線、0.6 mW、円柱形レンズで拡大) を例 2. b) (i) (I) の検出モジュールと組み合わせて使用した。

#### 【0163】

##### c) 結果

計測結果の選択を表 3 にまとめる。それぞれ等しいフルオロフォア濃度 ( $\mu\text{m}^2$  あたりフルオロフォア 10 個) の 10 個の隣接スポットを含む四つの区画から、減衰励起、すなわち、センサプラットフォーム (i) の未構成部分に位置する計測区域に励起光を内結合する場合、二つのそのような区画からそれぞれセンサプラットフォーム (i) 及び (ii) に適用される直接照射の場合、信号 (全信号と局所バックグラウンド信号との差としての正味蛍光信号)、バックグラウンド信号及びノイズを測定した。

#### 【0164】

直接照射の構造では、全プラットフォーム上で変調する単回折格子上の計測区域を有するセンサプラットフォーム (ii) の場合に、計測区域の領域に格子構造をもたないセンサプラットフォーム (i) の場合よりも有意に高い蛍光信号が観察された。適用された実験条件の下では、光学的に透明な導波層 (a) への励起光の内結合を、センサプラットフォーム (i) の場合、厳しく排除することができ、センサプラットフォーム (ii) の場合、多大な程度に無視することができ、

内結合が起こるような角度では、強く収束する励起光路に関して励起光の非常に小さな部分だけが格子構造に当たる。観察される蛍光強さの有意な増加は、非減衰的に励起される光学的に透明な層（a）の近接場に位置するフルオロフォアからの蛍光の有意な部分に帰されるはずである（この層に結合される）。しかし、格子構造の深さに依存する非常に短い伝播長ののち、連続的に変調する格子構造によって再び外結合される。外結合がセンサプラットフォームの所与のパラメータのために約 $-6^{\circ}$ の角度で起こるとき、外結合された部分はまた、対物レンズの高い開口数のため、検出器によって収集される。観察されるルミネセンスの増大の小さな部分はさらに、内結合される励起光の小さな部分に帰することができる。高い外結合効率が、バックグラウンド信号の有意な差は観察されないという観察によって実証され、その結果、逆結合された蛍光の、隣接計測区域間のクロストークを本発明にしたがって効率的に防ぐことができる。

#### 【0165】

同じパラメータを有するセンサプラットフォーム（i）の場合、ルミネセンス光の同様な部分が層（a）に内結合する。しかし、この場合、内結合された蛍光は、検出器の視野の外に位置する格子構造によってのみ外結合することができる、すなわちセンサプラットフォームの側方エッジから出ることができる。

#### 【0166】

10倍のフルオロフォア濃度を用いる計測は、両方のセンサプラットフォームに関して約10倍の高さの蛍光信号及び信号ノイズ比につながった。ノイズに対する正味信号の比は、相応に長い計測時間（10倍走査の場合で1分～10分の例で）、この例では約3の係数により、さらに改善することができる。

#### 【0167】

内結合条件下でセンサプラットフォーム（i）を用いる比較計測は、本発明のこの構造により、はるかに弱い励起光によっても感度をさらに有意に、すなわち、これらの条件下、露光時間に依存して5～12倍に高めることができることを実証した。この方法に関して、さらには、例の条件から自明であるように、有意に短い計測時間しか要らない。

#### 【0168】

【表 3】

表 3:

	直接励起： スキャナ418		減衰励起，プラットフォーム(i)		
	プラットフォーム (i)	プラットフォーム (ii)	1 秒	3 秒	10 秒
正味信号	196 +/-34	905 +/-228	541 +/- 21	1511 +/- 83	4097 +/-263
バック グラウンド	253 +/-8	237 +/-6	86 +/-5	241 +/- 15	683 +/-47
ノイズ	144 +/-4	164 +/-2	19.8 +/-0.4	30.5 +/-2.7	62 +/- 12
信号／ ノイズ	1.4 +/-0.3	5.5 +/-1.3	27.3 +/-0.5	49.6 +/-1.6	67 +/- 8

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 00/04869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 GOIN21/77 GOIN21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 GOIN

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 13320 A (TIEFENTHALER KURT ;ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH)) 18 March 1999 (1999-03-18) page 3 -page 7; figures 1-3 page 21 -page 27	1-66
X	US 5 738 825 A (PFEFFERKORN ROLAND ET AL) 14 April 1998 (1998-04-14) figures 5A-5F, 6A-6B, 7A-7G	1-66
A	WO 98 21571 A (BINDER ANDRES ;CIBA GEIGY AG (CH); EHRAT MARKUS (CH); OROSZLAN PET) 22 May 1998 (1998-05-22) page 10 -page 12; figures 3-6	1-66
A	EP 0 455 067 A (HOFFMANN LA ROCHE) 6 November 1991 (1991-11-06) figures 4,5	1-66
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*S\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 2000

Date of mailing of the international search report

02/11/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mason, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 00/04869

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 082 629 A (GOLDMAN DON S ET AL) 21 January 1992 (1992-01-21) figure 5	1-66
A	US 5 779 978 A (HARTMANN PAUL ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) figures 1-3	1-66

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/04869

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9913320 A	18-03-1999	EP 1012580 A	28-06-2000
US 5738825 A	14-04-1998	DE 69420375 D	07-10-1999
		DE 69420375 T	18-05-2000
		EP 0660924 A	05-07-1995
		JP 8504955 T	28-05-1996
		WO 9503538 A	02-02-1995
WO 9821571 A	22-05-1998	AU 5479998 A	03-06-1998
		BR 9712934 A	28-03-2000
		EP 1021708 A	26-07-2000
EP 0455067 A	06-11-1991	CA 2041438 A	04-11-1991
		JP 3071859 B	31-07-2000
		JP 5346398 A	27-12-1993
		US 5455178 A	03-10-1995
US 5082629 A	21-01-1992	CA 2072588 A	30-06-1991
		EP 0507883 A	14-10-1992
		JP 6502012 T	03-03-1994
		WO 9110122 A	11-07-1991
US 5779978 A	14-07-1998	AT 403745 B	25-05-1998
		AT 38396 A	15-09-1997
		EP 0793090 A	03-09-1997
		EP 0987539 A	22-03-2000
		JP 3054756 B	19-06-2000
		JP 9325116 A	16-12-1997

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 37/00	1 0 2	G 0 1 N 37/00	1 0 2
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	ドッフェネク, ゲルト・エル ドイツ国、デー79189 パート・クロツ インゲン、エツマッテンヴェーク 34		
(72)発明者	エーラート, マルクス スイス国、ツェーハー4312 マグデン、 イム・ブリュエール 6		
(72)発明者	クレスパッハ, ゲルハルト・エム ドイツ国、デー79219 シュタウフェン、 ブルクハルデンヴェーク 6		
(72)発明者	ノイシェーファー, ディーター スイス国、ツェーハー4132 ムッテン ツ、パッベルヴェーク 6		
Fターム(参考)	2G043 BA16 CA03 DA02 DA06 EA01 EA02 FA03 HA01 HA07 JA02 JA04 KA02 KA05 KA09 LA01 LA03 NA05 2G045 AA28 CA25 CA26 CB03 CB20 DA12 DA13 DA14 DA20 DA30 DA36 FA11 FA19 FB02 FB03 FB07 HA16 JA04		